

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER PHOSPHOGLYCERATMUTASE DER MAUS;
ONTOGENIE UND PHYLOGENIE
DER PHOSPHOGLYCERATMUTASE ISOZYME

Reinald Fundele

Diss. München
1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHOGLYCERATMUTASE
DER MAUS;
ONTOGENIE UND PHYLOGENIE DER PHOSPHOGLYCERATMUTASE-ISOZYME.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der LUDWIG-MAXIMILIANS-Universität
München

Vorgelegt von

Reinald Fundele
aus Kressbronn

München, Oktober 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn
1. Sondergutachter: Prof. Dr. Th. Bücher
2. Sondergutachter: Prof. Dr. W. Krietsch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1983

Meinen Lehrern

Th. Bücher

W. K. G. Krietsch

H. Nagano

I. Yamaguchi

INHALTSVERZEICHNIS

1	Vorbereitung	1
2	Einleitung	2
3	1. Teil	3
4	2. Teil	4
5	3. Teil	5
6	4. Teil	6
7	5. Teil	7
8	6. Teil	8
9	7. Teil	9
10	8. Teil	10
11	9. Teil	11
12	10. Teil	12
13	11. Teil	13
14	12. Teil	14
15	13. Teil	15
16	14. Teil	16
17	15. Teil	17
18	16. Teil	18
19	17. Teil	19
20	18. Teil	20
21	19. Teil	21
22	20. Teil	22
23	21. Teil	23
24	22. Teil	24
25	23. Teil	25
26	24. Teil	26
27	25. Teil	27
28	26. Teil	28
29	27. Teil	29
30	28. Teil	30
31	29. Teil	31
32	30. Teil	32
33	31. Teil	33
34	32. Teil	34
35	33. Teil	35
36	34. Teil	36
37	35. Teil	37
38	36. Teil	38
39	37. Teil	39
40	38. Teil	40
41	39. Teil	41
42	40. Teil	42
43	41. Teil	43
44	42. Teil	44
45	43. Teil	45
46	44. Teil	46
47	45. Teil	47
48	46. Teil	48
49	47. Teil	49
50	48. Teil	50
51	49. Teil	51
52	50. Teil	52
53	51. Teil	53
54	52. Teil	54
55	53. Teil	55
56	54. Teil	56
57	55. Teil	57
58	56. Teil	58
59	57. Teil	59
60	58. Teil	60
61	59. Teil	61
62	60. Teil	62
63	61. Teil	63
64	62. Teil	64
65	63. Teil	65
66	64. Teil	66
67	65. Teil	67
68	66. Teil	68
69	67. Teil	69
70	68. Teil	70
71	69. Teil	71
72	70. Teil	72
73	71. Teil	73
74	72. Teil	74
75	73. Teil	75
76	74. Teil	76
77	75. Teil	77
78	76. Teil	78
79	77. Teil	79
80	78. Teil	80
81	79. Teil	81
82	80. Teil	82
83	81. Teil	83
84	82. Teil	84
85	83. Teil	85
86	84. Teil	86
87	85. Teil	87
88	86. Teil	88
89	87. Teil	89
90	88. Teil	90
91	89. Teil	91
92	90. Teil	92
93	91. Teil	93
94	92. Teil	94
95	93. Teil	95
96	94. Teil	96
97	95. Teil	97
98	96. Teil	98
99	97. Teil	99
100	98. Teil	100

Hiermit bedanke ich mich bei allen, ohne deren Hilfe diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1	Tiere	3
2.2	Tierhaltung	4
2.3	Präparation von Organen und Embryonen	4
2.4	Chemikalien	6
2.5	Puffer	6
2.6	Bestimmung der Enzymaktivitäten	6
2.6.1	PGAM	6
2.6.2	LDH-Test	7
2.7	Cellogel-Elektrophorese	8
2.7.1	PGAM-Elektrophorese	8
2.7.2	LDH-Elektrophorese	9
2.8	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	9
2.9	Proteinbestimmung	11
2.10	Gele für die Chromatographie	11
2.10.1	Molekularsiebgele	11
2.10.2	Ionenaustausch-Chromatographie	11
2.10.3	Hydroxylapatit-Chromatographie	11
2.10.4	Hydrophobe Chromatographie	11
2.10.5	Affinitäts-Chromatographie	11
3.	Ergebnisse	13
3.1	Isolierung von PGAM-B ₂ aus Skelettmuskel der Maus	13
3.1.1	Gewinnung des Rohextrakts	13
3.1.2	Ammoniumsulfatfällung	13
3.1.3	Affinitätselutions-Chromatographie über CM-Sephadex C-50	13
3.1.4	Molekularsiebgel-Chromatographie über S-200 sf und G-15 sf	14
3.1.5	Ionenaustausch-Chromatographie über DEAE-Sephadex CL-6B	14
3.2	Isolierung der PGAM-B ₂ aus Skelettmuskel des Mississippi- alligators	16
3.1.1	Gewinnung des Rohextrakts	16
3.2.2	Ammoniumsulfatfällung	16
3.2.3	Ionenaustausch-Chromatographie auf DEAE-Sephadex A-50	16
3.2.4	Molekularsiebgel-Chromatographie über G-75 sf und G-25 sf	16
3.2.5	Ionenaustausch-Chromatographie über DEAE-Sephadex CL-6B	17
3.2.6	Hydroxylapatit-Chromatographie	18
3.3	Isolation der PGAM-A ₂ aus Mäuseleber	19

3.3.1	Gewinnung des Rohextrakts	19
3.3.2	Ammonsulfatfällung	19
3.3.3	Hitzeschritt	19
3.3.4	Ionenaustauscher CM-Sephadex C-50	20
3.3.5	Ionenaustauscher DEAE-Sephadex CL-6B	20
3.3.6	Molekularsieb-Chromatographie über G-75 sf und G-15 sf	21
3.3.7	Hydrophobe Chromatographie über Phenyl-Sephadex CL-4B	21
3.3.8	Hydroxylapatit-Chromatographie	22
3.3.9	Gruppenspezifische Affinitäts-Chromatographie über Blaue Agarose	23
3.3.10	Molekularsieb-Chromatographie über S-200 sf und LH-20 sf	24
3.4	Isolation der PGAM-A ₂ aus Mäuseniere	24
3.4.1	Gewinnung des Rohextrakts	24
3.4.2	DEAE-Cellulose Sephacel	24
3.4.3	Hydrophobe Chromatographie auf Phenyl-Sephadex CL-4B	25
3.4.4	Gelfiltration über G-75 sf und G-15 sf	26
3.4.5	Affinitäts-Chromatographie auf Blaue Sephadex	27
3.4.6	Hydroxylapatit-Chromatographie	28
3.5	Physikalische und chemische Eigenschaften	29
3.5.1	Molekulargewichtsbestimmung	29
3.5.2	Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration	29
3.5.3	pH-Optimum	30
3.5.4	Temperatur-Optimum	31
3.5.5	pH-Stabilität	33
3.5.6	Temperaturstabilität	33
3.5.7	Stabilität in Gegenwart von Schwermetallen	36
3.6	Katalytische Eigenschaften	37
3.6.1	Cosubstratspezifität der PGAM	37
3.6.2	Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität der PGAM	37
3.6.3	Bisphosphatase-Aktivität der PGAM	38
3.6.4	Metallionenabhängigkeit der PGAM	39
3.6.5	Substratspezifität der PGAM	40
3.6.6	Spezifische Aktivitäten	40
3.7	Kinetische Eigenschaften	40
3.7.1	Hemmung durch PEP	40
3.7.2	Michaeliskonstanten	42
3.8	Immunologische Untersuchungen	46
3.8.1	Immunisieren der Tiere	46
3.8.2	Gewinnung der Seren	46

3.8.3	Kreuzreaktivität der Antikörper	46
3.9	Phylogenie der PGAM-Isozyme	47
3.9.1	Elektrophoretische Untersuchungen	47
3.9.1.1	Säuger	47
3.9.1.2	Vögel	48
3.9.1.3	Reptilien	49
3.9.1.4	Amphibien	50
3.9.1.5	Knochenfische	51
3.9.1.6	Knorpelfische	53
3.9.1.7	Rundmäuler	53
3.9.2	Immunologische Untersuchungen	54
3.9.2.1	Doppelimmundiffusion-Tests mit Anti-PGAM-B ₂ -Anti- körpern vom Kaninchen	54
3.9.2.2	Doppelimmundiffusion-Tests mit Anti-Alligator-PGAM-B ₂ - Antikörpern	54
3.10	Ontogenie und Gewebespezifität der PGAM-Isozyme der Maus	55
3.10.1	Gewebespezifität	55
3.10.2	PGAM-Isozymverteilung in den Präimplantationsstadien der Maus	56
3.10.3	PGAM-Aktivität in frühen Embryonalstadien der Maus	56
3.11	Genetische und cytogenetische Untersuchungen	57
3.11.1	Screening nach elektrophoretischen Varianten	57
3.11.2	Gen-Dosis-Effekt	57
4.	Diskussion	59
4.1	PGAM-Isolierungen	59
4.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	64
4.3	Katalytische und kinetische Eigenschaften	66
4.4	Phylogenie der PGAM	71
4.5	Gewebespezifität und Ontogenie der PGAM-Isozyme	77
5.	Zusammenfassung	81
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	83
7.	Literatur	86

1. EINLEITUNG

Phosphoglyceratmutasen (PGAM, EC 2.7.5.3), die die reversible Umlagerung vom 2-Phosphoglycerat zum 3-Phosphoglycerat katalysieren, wurden aus einer Vielzahl von Organismen, Vertebraten¹⁾, Evertetraten²⁾, höheren Pflanzen³⁾ und Mikroorganismen⁴⁾ isoliert. Der Schwerpunkt der meisten Arbeiten lag bei der Isolierung und teilweisen Charakterisierung der Phosphoglyceratmutasen, daneben wurden vor allem die Bisphosphatase- und Bismutaseaktivitäten des gereinigten Enzymes und der Mechanismus der Mutasereaktion untersucht. Dagegen fanden sich, mit Ausnahme einer kurzen Arbeit von OMENN und HERMODSON (Omenn und Hermodson, 1975), keine Veröffentlichungen, in denen eine gleichzeitige Isolierung und Charakterisierung der gewebespezifischen Isozyme der Säugetiere beschrieben wurde, obwohl das Auftreten von Isozymen bereits 1970 (Diederich et al., 1970) auf Grund der unterschiedlichen Hg⁺⁺-Labilität von Phosphoglyceratmutase aus verschiedenen Organen des Schweins postuliert wurde. Später konnte gezeigt werden, daß in den Geweben der Säuger drei Isozyme vorhanden sind (Omenn et al., 1974; Chen et al., 1974; Omenn und Hermodson, 1975).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Fundele, 1979) wurde für die Maus (Fundele et al., 1981) und für den Menschen (Junien et al., 1982) nachgewiesen, daß zwei Phosphoglyceratmutasegene (Pgam-1 und Pgam-2 bei der Maus) existieren, die bei gleichzeitiger Expression in den Zellen eines Gewebes, bedingt durch den dimeren Aufbau des Enzyms, drei Isozyme bilden. Mit Hilfe einer neu entwickelten Methode (Bücher et al., 1980) konnte die Aktivitätsverteilung innerhalb der Isozymmuster quantifiziert werden.

Im Gegensatz zu den Säugern zeigten Gewebeextrakte von Vögeln nach elektrophoretischer Auftrennung nur eine Bande (Omenn und Hermodson, 1975). Weitere Untersuchungen zur Phylogenie der Phosphoglyceratmutase-Isozyme bei den Vertebraten waren jedoch nicht durchgeführt worden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die homodimeren Isozyme der Maus erstmals isoliert und vergleichend charakterisiert werden, dafür war die Bestimmung von physikalisch-chemischen und kinetischen Eigenschaften der Isozyme erforderlich. Zum einen sollte damit die molare Verteilung der Isozyme, bzw. die molare Expression der beiden Strukturgene, aus der Aktivitätsverteilung abgeleitet werden, zum anderen wurde erwartet, daß sich bei Kenntnis der kinetischen Eigenschaften Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des gewebespezifischen Auftretens der Isozyme ziehen lassen.

Um die Phylogenie der Phosphoglyceratmutaseisozyme in der Vertebratenevolution zu untersuchen, wurden die Phosphoglyceratmutasephänotypen bei Vertretern aller Vertebratenklassen durch elektrophoretische Auftrennung dargestellt, in weiteren Versuchen sollte durch die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen Phosphoglyceratmutasen verschiedener Spezies Homologien zwischen den Isozymen entfernt verwandter Arten aufgezeigt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Versuch unternommen, Pgam-2 zu kartieren. Von den bereits kartierten Genen der Maus und des Menschen, die für Isozyme der Glykolyse codieren, ist bekannt, daß sie auf verschiedenen Kopplungsgruppen liegen (z.B. Pgk-1 und Pgk-2 der Maus (Nielsen und Chapman, 1978; Eicher et al., 1977), die auf dem X-Chromosom, bzw. auf Chromosom 17 liegen, oder die Phosphofruktokinasen L und F, die auf Chromosom 21 bzw. 10 des Menschen kartiert wurden (Vora und Francke, 1981; Weil et al., 1980)). Pgam-1 und Pgam-2 der Maus, und PGAMA und PGAMB des Menschen sind mit Sicherheit ebenfalls nicht syntän, so daß eine Kartierung von Pgam-2 und PGAMB noch fehlt. Es wäre denkbar, daß sowohl Pgam-2 und PGAMB wie Pgam-1 und PGAMA einer konservativen Kopplungsgruppe angehören.

1) Cowgill und Pizer, 1956; Rodwell, Towne und Grisolia, 1957; Torralba und Grisolia, 1966; Hakrness und Ponce, 1969; Diederich et al., 1970; James, Hurst und Flynn, 1971; James, Hurst, und Flynn, 1972; Sasaki et al., 1975; Omenn und Hermodson, 1975; Niebauer, 1975; Sheibley und Hass, 1976; Narita et al., 1979; Bartrons und Carreras, 1982; Scopes und Stoter, 1982; Petell, Killion und Lebherz, 1982; Kulbe, Foellmer und Fuchs, 1982.

2. Schulman und Valentine, 1982.

3. Ito und Grisolia, 1959; Fernandez und Grisolia, 1960.

4. D'Alessio und Josse, 1971; Hill und Attwood, 1976; Watabe und Freeze, 1979; Kawai et al., 1981.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere

Für die Isolierung der PGAM-Isozyme wurden Leber, Niere und Skelettmuskel von Hybriden aus C3H, 101 und "Teststock" verwendet. Diese Tiere wurden uns freundlicherweise von der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg, überlassen. Für die Organentnahme wurden Tiere durch Begasen mit CO₂ oder durch Genickbruch getötet.

Die Gewebsspezifität der PGAM-Isozyme wurde an Organen von C3H/Aa-Mäuse bestimmt. Diese Linie wurde durch Inzucht (mehr als 10 Generationen) aus Wildmaus x C3H/Aarhus-Hybride, die uns Herr Dr. T. NIELSEN, Institut für Ökologie und Genetik der Universität Aarhus, überlassen hatte, hergestellt.

Frühe Embryonen wurden aus NMRI x C57BL/6JHan-Hybriden (F₁) isoliert. Beide Stämme wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bezogen und werden seitdem in unserem Labor weitergezüchtet. C57BL/6JHan wird über Schwester x Bruder Verpaarungen ingezüchtet, NMRI ist ein nicht ingezüchteter Stamm.

Für die Zucht wurden uns von Prof. Dr. A. GRÖPP und Dr. H. WINKING (Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Lübeck) die folgenden doppelt heterozygoten Tiere mit Robertson'schen Translokationen überlassen:

Rb(8,12)5Bnr/Rb(4,12)9Bnr

Rb(8,14)16Rma/Rb(9,14)6Bnr

Rb(9,16)9Rma/Rb(11,16)2H

Rb(9,19)163H/Rb(8,19)1Ct

Durch Verpaarung dieser Tiere mit NMRI-Mäuse wurden Embryonen mit der Trisomie 12, 14, 16, 18 und 19 erzeugt.

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden folgende Tiere verwendet: Mensch (*Homo sapiens*), Hauskatze (*Felis felis*), Hausschwein (*Sus scrofa domestica*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Hausmaus (*Mus musculus*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), Haushuhn (*Gallus gallus*), Haustaube (*Columbia livia*), Sperling (*Passer domesticus*), Kohlmeise (*Parus major*), Stockente (*Anas platyrhynchos*), Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*), Bläßhuhn (*Fulica atra*), Dreikielschildkröte (*Chinemys reevesii*), Afrikanischer Hausgecko (*Hemidactylus brooksi*), Mississippialligator (*Alligator mississippiensis*), Wasserfrosch (*Rana esculentea*), Aga (*Bufo marinus*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), Wassermolch (*Notophthalmus viridescens*), Aal (*Anguilla anguilla*), Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*), Brachse (*Abramis brama*), Buntbarsch (*Hemichromis bimaculatus*), Dornhai (*Squalus acanthias*), Katzenhai (*Scyliorhinus caniculus*), Bachneunauge

(*Lampetra planeri*), Flußneunauge (*Lampetra fluviatilis*).

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden Deutsche Riesenschecken oder Zwerghasen verwendet.

2.2 Tierhaltung

Mäuse und Kaninchen wurden in nicht pathogenfreien Räumen bei einer Temperatur von 22-23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55-60 % gehalten. Die Tiere wurden mit Diätfutter von Altromin und Leitungswasser ad libitum ernährt.

2.3 Präparation von Organen und Embryonen

Zur PGAM-Isolierung wurden Leber, Niere und Skelettmuskel entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -27 °C aufbewahrt.

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die folgenden Organe oder Teile davon verwendet: Skelettmuskel, Herz, Niere, Milz, Lunge, Leber, Gehirn und Blut. Die Gewebe wurden nach der Entnahme in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und, wenn möglich, sofort weiterverarbeitet. Nach der Bestimmung des Frischgewichts wurden sie mit der Präparierschere zerkleinert, in einem fünffachen Volumen Puffer F aufgenommen und mit einem Mikropotter homogenisiert. Die Gewebs-Extrakte wurden 20 min bei 36.000 g zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge RC2-B, Rotor SS 34). Blutproben wurden in heparinisierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder Mikro-Hämatokritkapillaren aufgenommen, 2 min bei 19.000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand und der Leukozytensaum über den Erythrozyten abgesaugt und durch das gleiche Volumen Puffer F ersetzt. Lysiert wurde mit Extraktionspuffer, dem Saponin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml zugesetzt war. Nach Hämolysen wurden die Erythrozytenmembranen abzentrifugiert. Bei den niederen Vertebraten wurde die aus den Zellkernen der Erythrozyten freiwerdende DNS mit CaCl_2 gefällt. Nach Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die Rohextrakte mit modifiziertem Puffer D (1:1 Glycerol, 97% p.a. und Puffer D) soweit verdünnt, daß die auf ein Gel aufgetragenen Proben eine identische Aktivität von 0,2 bis 0,8 U/ μl hatten. Für die ontogenetischen Untersuchungen wurden NMRI x C57BL/6JHan-Hybrid- oder NMRI-Weibchen superovuliert. Ungefähr 58 h vor Beginn der Verpaarungsperiode wurden 5 I.U. Gonadotropin aus trächtigen Stuten (SIGMA Chemie GmbH München), 48 h später 5 I.U. Humanchoriongonadotropin intraperitoneal injiziert. Die Gonadotropine waren in steril filtrierter physiologischer NaCl-Lösung gelöst worden. Die Verpaarung der Weibchen mit männlichen NMRI x

C57BL/6JHan-Hybriden erfolgte über Nacht. Bei Vorhandensein eines Vaginalpfropfs am folgenden Morgen wurden die Weibchen von den Männchen getrennt und zu den vorgegebenen Zeiten getötet (der Pfropftag wurde als erster Tag der Embryonalentwicklung gerechnet). Die Embryonen wurden mit steril filtriertem modifiziertem Whitten's Medium aus dem Reproduktionstrakt gespült. Die am Tag 1 vorhandenen Kumuluszellen wurden mit Hyaluronidase (SIGMA), die Zona pellucida mit Pronase (SIGMA) entfernt. Alle Manipulationen erfolgten in modifiziertem Whitten's Medium unter einer Atmosphäre von 95% N_2 und 5% CO_2 unter dem Stereomikroskop M7S (Wild, Heerbrugg). Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in Mikroküvetten in einem Zweiwellenlängen-Spektralphotometer (Sigma ZWS 11). Der Testansatz betrug 100 μ l; die durch Einfrieren - Auftauen lysierten Embryonen wurden mit einem minimalen Volumen modifiziertem Whitten's Medium direkt in den Testansatz geblasen und die Reaktion bei 340 gegen 365 nm verfolgt.

Für die elektrophoretische Trennung wurden mehrere Embryonen in einem geringen Volumen Medium in eine gezogene Mikrokapillare aufgenommen, bei $-27^\circ C$ eingefroren und nach dem Auftauen direkt auf das Gel aufgetragen.

Für die Gen-Dosis-Untersuchung wurden folgende Präparationen durchgeführt:

1. Chromosomenpräparation

Mindestens 2 h vor der Tötung der Tiere wurden trächtigen Weibchen 200 μ l einer Colcemidlösung (Ciba-Geigy AG, Basel) von 0,1 mg/ml in steriler physiologischer NaCl-Lösung injiziert. Bis einschließlich des fünfzehnten Tages der Embryonalentwicklung wurden zur Chromosomenpräparation die embryonalen Eihüllen verwendet. Die Inkubationsdauer der Eihüllen eines dreizehntägigen Foeten in 1%iger Na_3 -Citrat-Lösung betrug 40 min, die eines fünfzehntägigen Foeten 50 min. Nach Ablauf der zum Quellen der Zellkerne vorgeschriebenen Zeit wurde die Na_3 -Citrat-Lösung abgesaugt und durch ein Fixiermedium aus Methanol und Eisessig (3:1) ersetzt. Nach frühestens 2 h wurden die Eihäute aus dem Fixiermedium entfernt und in 60%iger Essigsäure mazeriert. Die Suspension wurde auf einen fettfreien, $50^\circ C$ warmen Objektträger getüpfelt und die Metaphasenplatten im Phasenkontrastmikroskop (Diavert, Leitz Wetzlar) ausgezählt. Das Vorhandensein von zwei metazentrischen Chromosomen deutete auf den trisomen Status des Foeten hin.

Ab dem sechzehnten Tag der Entwicklung mußte Lebergewebe zur Chromosomenpräparation verwendet werden. Das fein zerschnittene Gewebe wurde 25 min in 0,5%iger KCl-Lösung inkubiert. Die weitere Präparation erfolgte wie beschrieben.

2. Organpräparation

Es wurden ausschließlich die Hauptkammern der foetalen Herzen entnommen, die zunächst mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen wurden. Nach der Bestimmung der Frischgewichte wurden die Herzen in einem fünfzigfachen Volumen Puffer D homogenisiert. Die Homogenisate wurden 20 min bei ca. 36.000 g zentrifugiert und in den Überständen die Aktivitäten der PGAM und der LDH bestimmt.

2.4 Chemikalien

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Enzyme und Substrate von der Firma Boehringer GmbH, Mannheim, andere Chemikalien von Merck, Darmstadt, und Gele zur Proteintrennung von der Deutschen Pharmacia, Freiburg, bezogen.

2.5 Puffer

Puffer A: TRA-HCl, 50 mM, 10 mM MgSO_4 , eingestellt bei 20 °C auf pH 7,6 mit konz. NaOH, entgast.

Puffer B: TRA-HCl, 100 mM, eingestellt bei 20 °C auf pH 7,5 mit konz. NaOH, entgast.

Puffer C: Puffer B mit 2 mM EDTA

Puffer D: Puffer A mit 2 mM DTE und 0,1 % Rinderserumalbumin

Puffer E: TRA-HCl, 50 mM, eingestellt bei 20 °C auf pH 7,6 mit konz. NaOH, entgast.

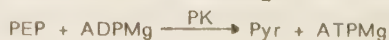
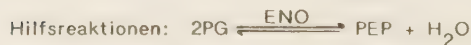
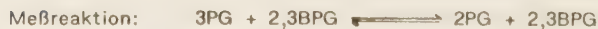
Puffer F: Puffer E, 2 mM DTE

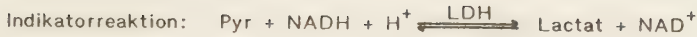
Wenn nicht anders erwähnt, wurden auch alle anderen Puffer bei 20 °C eingestellt und entgast.

2.6 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.6.1 PGAM

Die PGAM-Aktivitäten und die Michaelis-Menten-Konstanten für 3PG wurden mit der hinläufigen Glykolysereaktion bestimmt.



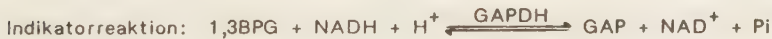


Es wurde folgende Testzusammensetzung verwendet:

	Küvettenkonzentration
Puffer A	44,6 mM
3PG	7,0 mM
2,3BPG	0,5 mM
ADP	1,0 mM
NADH	0,2 mM
ENO	3,0 U/ml
PK	7,0 U/ml
LDH	20,0 U/ml

Diese Zusammensetzung wird im folgenden als Standardtest bezeichnet.

Die Michaeliskonstanten der PGAM für 2PG und 2,3BPG wurden mit den rückläufigen Glykolysereaktionen bestimmt.



Testzusammensetzung:

	Konzentration
Imidazolpuffer, pH 6,8	84,2 mM
MgSO_4	8,4 mM
2PG	2,0 mM
2,3BPG	0,5 mM
ATP	2,9 mM
NADH	0,2 mM
PGK	21,0 U/ml
GAPDH	13,0 U/ml

2.6.2 LDH-Test

Die Aktivität der LDH wurde mit der hinläufigen Glykolysereaktion bestimmt.



	Küvettenkonzentration
Puffer E	47,2 mM
Pyruvat	2,4 mM
NADH	0,2 mM

Im Eppendorf-Photometer wurde bei 365 nm die durch Oxidation von NADH zu NAD^+ bedingte Extinktionsänderung gemessen.

Molarer Extinktionskoeffizient für NADH bei 365 nm:

$$3,4 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{)}$$

Enzymaktivitäten wurden in Internationalen Einheiten angegeben:

1 Unit = 1 μMol Substratumsatz/min, gemessen unter Standardbedingungen:

25 °C, Substratsättigung

Konzentration der Enzymaktivität in Lösung: U/ml

Spezifische Aktivität: U/mg Protein

2.7 Cellogel-Elektrophorese

2.7.1 PGAM-Elektrophorese

Cellogelelektrophoresen mit anschließender PGAM-spezifischer, negativer Aktivitätsanfärbung wurden wie folgt durchgeführt:

Trägermedium war gelatinierte Celluloseacetatfolie (Cellogel, 300 μM Schichtdicke).

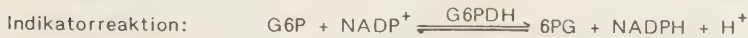
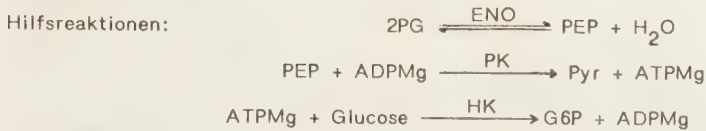
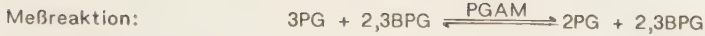
Elektrodenpuffer: 20 mM Veronal
 10 mM Na_3Citrat
 5 mM MgSO_4
 2 mM EDTA

Der Puffer wurde bei 20 °C mit konz. HCl auf pH 8,6 eingestellt. Vor der Elektrophorese wurde dem Elektrodenpuffer DTE in einer Konzentration von 0,65 mM zugesetzt. Die Trennung erfolgte bei 240 V über 60 min. In diesem System zeigten PGAM-A₂, PGAM-AB und PGAM-B₂ bei allen untersuchten Organismen eine deutlich unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit.

Die PGAM-Aktivitätsanfärbung entsprach dem Standardtest (2.6.1). Unter diesen Bedingungen wurden die PGAM-Banden unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm als dunkle Flecke im fluoreszierenden Gelhintergrund sichtbar.

Um kontrastreiche Photographien von den Gelen zu erhalten, wurde die NADH-Konzentration in einigen Fällen auf 2 mM erhöht.

Die quantitative Auswertung der PGAM-Isozymbanden wurde mit der positiven Aktivitätsanfärbung durchgeführt.



Testzusammensetzung:

Küvettenkonzentration:

Puffer E	44,8 mM
3PG	1,2 mM
2,3BPG	15 mM
Glucose	11,2 mM
ADP	1,9 mM
NADP	3,0 mM
MgSO ₄	9,7 mM
ENO	5,0 U/ml
PK	11,0 U/ml
G6PDH	5,0 U/ml
HK	10,0 U/ml

Da Adenylatkinase (EC 2.7.4.3) in diesem System ebenfalls anfärbte und eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit wie das PGAM-A₂ Isoenzym der Maus zeigte, wurde das Enzym durch Zugabe von 2,2 mM ADP in den Kathodenpuffer abgetrennt.

Die quantitative Auswertung der Elektrophoresen erfolgte wie von BÜCHER et al. (1980) beschrieben.

2.7.2 LDH-Elektrophoresen

Für die Trennung der LDH-Isozyme wurde Veronalpuffer, 20 mM, DTE 0,65 mM, pH 8,6 verwendet. Die Trennung erfolgte bei 100 V über 90 min.

Die Aktivitätsanfärbung erfolgte mit der rückläufigen Glykolyisereaktion.



Für die Anfärbung wurde folgender Ansatz verwendet:

	Konzentration
TRIS-Puffer pH 9	75 mM
Lactat	280 mM
NAD ⁺	3,8 mM

2.8. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde nach der von Kuntz (Kuntz et al., 1978) beschriebenen Methode durchgeführt.

Laufpuffer:	TRIS	25 mM	pH 8,3 mit konz. HCl bei 4 °C eingestellt
	Glycin	195 mM	
	SDS	0,1 %	

Probenpuffer:	TRIS	65 mM	pH 6,8
	SDS	3 %	
	Mercaptoäthanol	5 %	
	Glycerin	10 %	

Laufgel:	TRIS	0,37 M
	SDS	0,10 %
	Acrylamid	10,00 %
	Bisacrylamid	0,27 %
	Persulfat	0,015 %
	TEMED	0,0125 %

Für die Herstellung des Laufgels wurden alle Substanzen außer Natriumdodecylsulfat (SDS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zusammenpipettiert und entgast, um Blasenbildung des Gels bei anschließender Zugabe von SDS zu vermeiden. Zuletzt wurde die Polymerisation durch TEMED gestartet.

Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen bzw. gegen diesen dialysiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C.

Zur Reinheitsuntersuchung der PGAM wurden pro Geltasche maximal 100 µg Protein in 10-50 µl Volumen aufgetragen. Während des Einlaufens der Proteinlösung in das Gel betrug die Spannung 60 min lang 110 V, danach 5 h lang 220 V.

Die Gele wurden ca. 15 h in Coomassie Brilliantblaulösung (0,05 % Coomassie in Methanol/H₂O/Eisessig 5:5:1) angefärbt und im gleichen Lösungsmittelgemisch über

Nacht entfärbt.

2.9 Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen wurden mit der Biuret-Methode, modifiziert nach BEISENHERZ (Beisenherz G. et al., 1953) mit 1/10 des angegebenen Ansatzes durchgeführt. Um Fremdfärbung auszuschließen wurde mit KCN entfärbt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte aus der Extinktion des Farbkomplexes bei 546 nm mit einem Lichtweg von 1 cm über den Umrechnungsfaktor 37 mg/ml (Kuntz, G. W. K. et al., 1978).

2.10 Gele für die Chromatographie

2.10.1 Molekularsiebgele

Sephadex G-75 superfine (sf), G-50 sf, G-25 sf und G-10 sf wurden drei Tage in dem Puffer gequollen, in dem sie später in Säulen gefüllt wurden, entgast, nach Entfernen von "fines" in Säulen gefüllt und mit dem gleichen Puffer eluiert.

Sephacryl S-200 sf, das bereits gequollen geliefert wird, wurde auf einer Filternutsche abgesaugt, mit Puffer äquilibriert und in Säulen gefüllt.

2.10.2 Ionenaustauscher-Chromatographie

Die Sephadexionenaustauscher DEAE A-50 und CM C-50 wurden wie die Sephadexmolekularsiebe gequollen, auf einer Filternutsche abgesaugt und mehrfach mit einem 0,1 M Puffer des gewünschten pH-Wertes gewaschen. Anschließend wurden die Gele mit Puffer der später verwendeten Molarität äquilibriert. Die gequollen gelieferten Austauscher DEAE-Sephacel CL-6B und DEAE-Sephacel wurden wie die Sephadex-Ionenaustauscher behandelt.

2.10.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Für die Hydroxylapatit-Chromatographie wurde das Bio-Gel HT von BIO-RAD Laboratories verwendet, das bereits gequollen geliefert wird. Bio-Gel HT wurde wie ein Sepharose-Ionenaustauscher behandelt.

2.10.4 Hydrophobe Chromatographie

Phenyl-Sepharose CL-4B wurde wie die Sepharose-Ionenaustauscher behandelt.

2.10.5 Affinitäts-Chromatographie

Für die gruppenspezifische Affinitäts-Chromatographie wurden Blaue Agarose (Affi-Gel Blue, 100-200 mesh) von BIO-RAD laboratories und Blaue Sepharose verwendet. Affi-Gel Blue und Blaue Sepharose wurden wie die Sepharose-Ionen-

austauscher behandelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung der PGAM-B₂ aus Skelettmuskel der Maus

3.1.1 Gewinnung des Rohextrakts

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle folgenden Präparationsschritte bei 0 °C bis 4 °C durchgeführt.

Das bei -27 °C eingefrorene Material wurde bei 4 °C angetaut, in noch gefrorenem Zustand im Küchenmixer homogenisiert und nach Bestimmung des Frischgewichts in einem 3fachen Volumen TRAP, 100 mM, pH 7,5 aufgenommen und 2 h gerührt. Anschließend wurde das Homogenisat (zur Abtrennung von Fett) 60 min bei 42.000 g zentrifugiert und über Quarzwolle filtriert; von dem Extrakt wurden Gesamtaktivität und Proteinkonzentration bestimmt.

3.1.2 Ammoniumsulfatfällung (AS-Fällung)

Dem Homogenisat wurde schrittweise unter ständigem Rühren festes Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1,8 M zugegeben und ca. 16 h gerührt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert (60 min bei 42.000 g) und verworfen. Im Überstand wurde die AS-Konzentration auf 2,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhöht und über Nacht gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und das Sediment in gesättigter AS-Lösung in TRAP, 100 mM, pH 7,5 suspendiert.

3.1.3 Affinitätselutions-Chromatographie über CM-Sephadex C-50

Aliquots der AS-Fällung wurden 20 min bei 42.000 g zentrifugiert, das Sediment in Natriumkakodylatpuffer, 10 mM, EDTA, 2 mM, pH 5,8 (CM-Puffer) aufgenommen und gegen 2 l dieses Puffers über Nacht dialysiert. In Abhängigkeit von der aufzutragenden Menge an Dialysat wurden zwei Säulen mit den Dimensionen 19,7 x 110 mm und 33 x 110 mm verwendet. Die Säulen wurden mit einer Geschwindigkeit von 15 ml/h bzw. 30 ml/h beladen und eluiert.

Nach dem Auftragen des Dialysats auf die Säule wurde mit einem zweifachen Säulenvolumen CM-Puffer, pH 6,2 gewaschen. Die PGAM wurde mit einem halben Säulenvolumen CM-Puffer, pH 6,2, dem 1 mM 2,3BPG zugesetzt war, eluiert. Durch die Bindung des negativ geladenen Substrates an die PGAM wird die elektrostatische Bindung an den negativ geladenen Ionenaustauscher beeinträchtigt und das Enzym wird eluiert (Abb. 1). Das Eluat wurde auf PGAM-Aktivität getestet, die Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und von diesem Pool nochmals Aktivität und Protein gemessen. Aktivitätsmessungen, zur Berechnung der Ausbeute und der Spezifischen Aktivität wurden nach 15 min Reaktivierung in Puffer D durchgeführt. Das im Pool enthaltene Protein wurde durch Dialyse gegen gesättigte AS-Lösung ausgefällt.

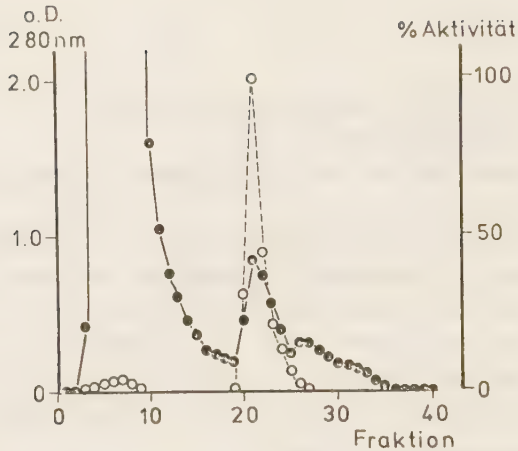


Abb. 1: Elutionsdiagramm der CM-Sephadex-Säule (Die Aktivität der Spitzenfraktion wurde gleich 100 % gesetzt. ●— Proteinkonzentration, ○--- Aktivität)

3.1.4 Molekularsiebgel-Chromatographie über S-200 sf und G-15 sf

Die nach CM-Sephadex erhaltene AS-Fällung wurde 20 min bei 42.000 g zentrifugiert und das Sediment in einem möglichst kleinen Volumen TRAP, 100 mM, pH 7,5 aufgenommen. Nach Abtrennung des denaturierten Proteins wurde die Probe auf das Gel aufgetragen und mit Puffer B eluiert (Abb. 2).

Sephacryl S-200 sf wurde mit G-15 sf überschichtet um eine erhöhte mechanische Festigkeit der Gelbetttoberfläche beim Auftragen und eine schnelle Abtrennung des AS zu erzielen.

Alle Chromatographien wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulendimensionen: G-15 sf 20 x 20 mm; S-200 sf 20 x 950 mm; Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h; Fraktionsvolumen: 6,5 ml

Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden durch Dialyse gegen gesättigte As-Lösung ausgefällt.

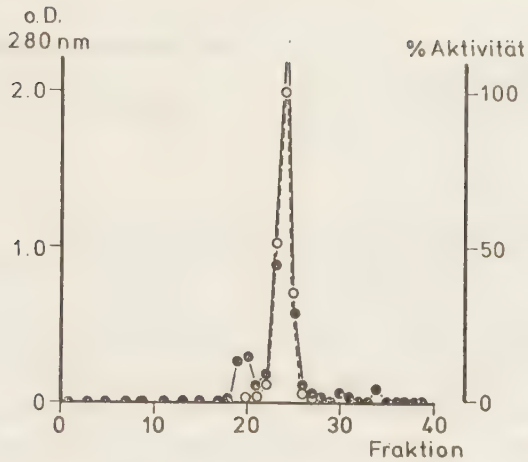


Abb. 2: Gelfiltration auf S-200 sf. ●—o.D., o--- Aktivität)

3.1.5 Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose CL-6B

Die nach S-200 sf erhaltene AS-Fällung wurde zentrifugiert, das Sediment in TRIS, 20 mM, pH 8,2 gelöst und gegen diesen Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule (33 x 30 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h).

Die PGAM-B₂ wurde unter diesen Bedingungen nicht an DEAE-Sepharose gebunden, enthielt aber keine Verunreinigung mehr. In der SDS-PAGE zeigte diese Präparation eine scharfe und einheitliche Bande. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Übersicht über den Präparationsgang

Reinigungsschritt	Aktivität 10 ⁵ U	Protein g	spez.Akt. U/mg Prot.	Ausbeute %
Rohextrakt	9,5	19,5	48,6	100
AS-Fällung	5,4	10,3	52,4	57,1
CM-Sephadex*	4,7	2,74	173	49,9
S-200 sf*	3,5	0,89	392	36,8
DEAE-Sepharose*	1,6	0,31	510	16,8

* Da für Präparationen ab CM-Sephadex nur Aliquots der AS-Fällung verwendet wurden, wurden die Daten der folgenden Präparationsschritte auf die Werte der AS-Fällung hochgerechnet.

3.2. Isolierung der PGAM-B₂ aus Skelettmuskel des Mississippialligators

3.2.1 Gewinnung des Rohextrakts

Der erste Präparationsschritt erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei Mäuseskelettmuskel 3.1.

3.2.2 Ammoniumsulfatfällung

Es wurden gegenüber 3.1.2 zwei Modifikationen eingeführt:

Die erste Fällung erfolgte bei 1,2 M AS, die zweite Fällung bei 2 M AS. Ansonsten wurde wie unter 3.1.2 beschrieben präpariert.

3.2.3 Ionenaustausch-Chromatographie DEAE-Sephadex A-50

Die unter 3.2.2 erhaltene AS-Fällung wurde zentrifugiert (20 min bei 42.000 g), in TRIS, 50 mM, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, pH 7,8 gelöst und über Nacht gegen 2 ! Puffer dialysiert. Zu dem Dialysat wurde ein doppeltes Volumen gegen den beschriebenen Puffer äquilibriertes DEAE-Sephadex A-50 gegeben und 30 min geschüttelt. Unter diesen Bedingungen bindet die PGAM nicht an den Ionenaustauscher. Der Austauscher wurde über Filterpapier filtriert, und das Gel mit Puffer gewaschen, bis ca. 75 % der PGAM-Aktivität im Filtrat waren. Bei einer unzureichenden Elution wurde die MgSO₄-Konzentration im Waschpuffer auf 15 mM erhöht. Das im Filtrat enthaltene Protein wurde durch Dialyse gegen gesättigte AS- Lösung ausgefällt.

3.2.4 Molekularsiebgel-Chromatographie über G-75 sf und G-25 sf.

Die unter 3.2.3 erhaltene AS-Fällung wurde, wie unter 3.1.4 beschrieben, weiterbehandelt.

Die Säulenchromatographieläufe wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulendimension: 39 x 35 mm G-25 sf

39 x 870 mm G 75 sf

Durchflußgeschwindigkeit: 30 ml/h; Fraktionsvolumen: 8,2 ml. Die Säule wurde mit 5-15 ml Proteinlösung geladen und mit Puffer B eluiert (Abb. 3).

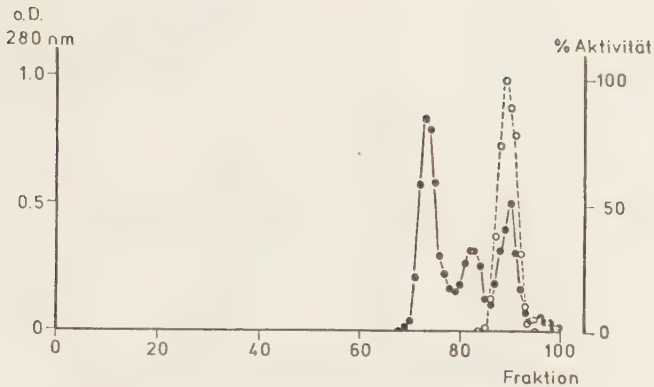


Abb.3: Gelfiltration auf G-75 sf. ●— o.D., o--- Aktivität

3.2.5 Ionenaustausch-Chromatographie über DEAE-Sepharose CL-6B

Die AS-Fällung von 3.2.4 wurde zentrifugiert, das Sediment in TRIS, 20 mM, pH 8,6 gelöst und gegen das 500fache Volumen Puffer dialysiert. (Unter diesen Bedingungen wurde die Krokodilmuskel-PGAM-B₂ irreversibel inaktiviert. Da dieses Isozym nur zur Gewinnung von Antikörpern isoliert werden sollte, wurde dieser Schritt dennoch beibehalten.) Das dialysierte Protein wurde auf die DEAE-Sepharose-Säule (9 x 60 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h; Fraktionsvolumen 4,0 ml).

Die an das Gel gebundene PGAM wurde mit einem linearen Gradienten aus je 20 ml TRIS, 20 mM, pH 8,6 und TRIS, 20 mM, pH 8,6, MgSO₄, 50 mM eluiert (Abb. 4).

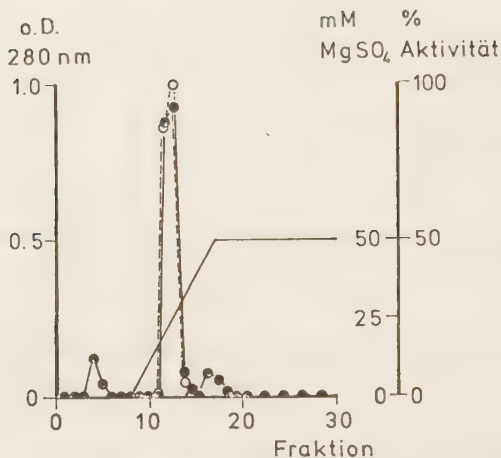


Abb. 4: Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose. ●—o.D., ○---Aktivität, —Gradient

3.2.6 Hydroxylapatit-Chromatographie

Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen KH_2PO_4 -Puffer, 20 mM, pH 7,0 dialysiert und anschließend auf eine Hydroxylapatitsäule (9 x 48 mm) aufgetragen. Die PGAM wurde mit einem linearen Konzentrationsgradienten aus 50 ml KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7,0 und 50 ml KH_2PO_4 , 120 mM, pH 7,0 eluiert (Abb. 5). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug beim Beladen und Waschen der Säule 30 ml/h, bei der Elution 15 ml/h, das Fraktionsvolumen war 5,2 ml.

Nach Hydroxylapatit-Chromatographie zeigte die PGAM in der SDS-PAGE keine Verunreinigung mehr und wanderte als scharfe und einheitliche Bande.

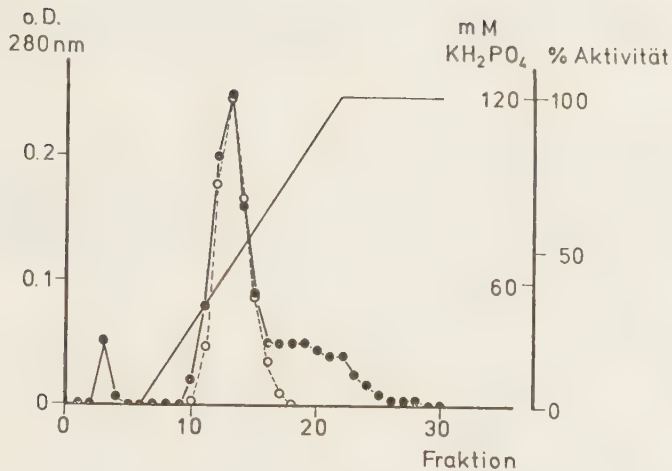


Abb. 5: Chromatographie der Krokodilmuskel-PGAM auf Hydroxylapatit. ●— o.D., ○--- Aktivität, — Gradient

Tabelle 2: Präparation der Krokodilmuskel-PGAM

Reinigungsschritt	Aktivität	Protein	Spez.Akt.	Ausbeute
	U	mg	U/mg Protein	%
Rohextrakt	12900	4450	2,9	100
AS-Fällung	9400	426	22,1	73
DEAE-Sepharose	8080	74	109,0	63
G-75	5540	20	277,0	43
DEAE-Sepharose	965	15,4	62,7	7,5
Hydroxylapatit	540	14,0	38,6	4,2

3.3 Isolation der PGAM-A₂ aus Mäuseleber

3.3.1 Gewinnung des Rohextrakts: siehe 3.1.1

3.3.2 AS-Fällung: siehe 3.2.2

3.3.3 Hitzeschritt

Ein Aliquot der Leber-AS-Fällung wurden zentrifugiert, das Sediment in Citratpuffer, 20 mM, MgSO₄, 5 mM, pH 5,8 aufgenommen und über Nacht gegen 5 l Puffer dialysiert. Dem Dialysat wurde 2,3BPG bis zu einer Konzentration von 1

mM zugegeben, dann wurde es im Wasserbad unter ständigem Rühren auf 50 °C erhitzt. Nach 5 min bei 50 °C wurde die Proteinlösung in ein Eisbad gestellt und dann 20 min bei 42.000 g zentrifugiert.

3.3.4 Ionenaustauscher CM-Sephadex C-50

Zum Überstand der Hitzedenaturierung wurde das doppelte Volumen gegen Citratpuffer äquilibriertes CM-Sephadex C-50 gegeben und 30 min geschüttelt. Unter diesen Bedingungen bindet die PGAM-A₂ nicht an den Austauscher. Das weitere Verfahren wurde wie unter 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.5 Ionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B

Die AS-Fällung von 3.3.4 wurde zentrifugiert, in TRIS, 20 mM, pH 8,2 gelöst und gegen 2 l Puffer über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule (33 x 110 mm) aufgetragen. Anschließend wurde mit dem 2,5fachen Säulenvolumen Puffer und MgSO₄, 25 mM nachgewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit beim Beladen und Waschen der Säule betrug 120 ml/h. Das Protein wurde mit einem nicht linearen Gradienten aus 100 ml TRIS 20 mM, und 95 ml TRIS, 20 mM, MgSO₄, 120 mM, pH 8,2 eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h, das Fraktionsvolumen 8,0 ml. Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen (Abb. 6) wurden vereinigt und das Protein durch Dialyse gegen gesättigtes AS ausgefällt.

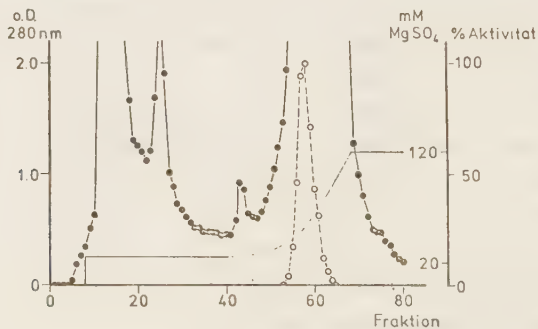


Abb. 6: Ionenaustauschchromatographie der PGAM-A₂ aus Mäuseleber auf DEAE-Sepharose CL-6B. ●— o.D., o--- Aktivität, --- Gradient (Der nicht lineare Gradient zeigte, bedingt durch die Form der Gefäße, einen asymptotischen Anstieg. Die getüpfelte Kurve gibt einen angenommenen Verlauf wieder)

3.3.6 Molekularsieb-Chromatographie über G-75 sf und G-15 sf

Die Gelchromatographie wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

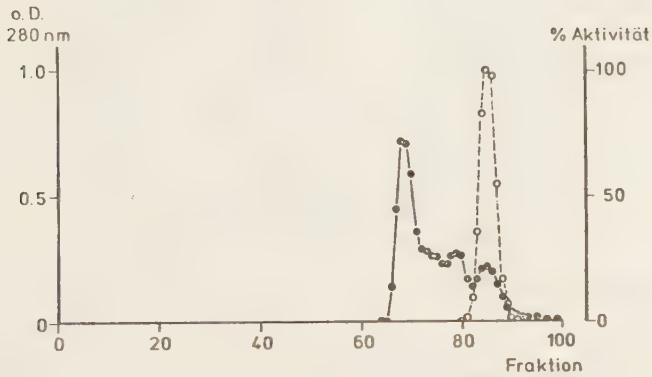


Abb. 7: Molekularsiebgelchromatographie der PGAM-A₂ aus Mäuseleber auf G-15 und G-75, ●— o.D., o--- Aktivität

3.3.7 Hydrophobe Chromatographie über Phenyl-Sepharose CL-4B

Die nach 3.3.6 erhaltene AS-Fällung wurde zentrifugiert, das Sediment in TRAP, 100 mM, NaCl, 950 mM, pH 7,5, aufgenommen und ohne vorherige Dialyse auf eine Phenyl-Sepharose-Säule (9 x 60 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h, Fraktionsvolumen: 4,2 ml). PGAM-A₂ bindet unter diesen Bedingungen nicht an die Phenyl-Sepharose und wird als scharfe Proteinbande eluiert (Abb. 8).

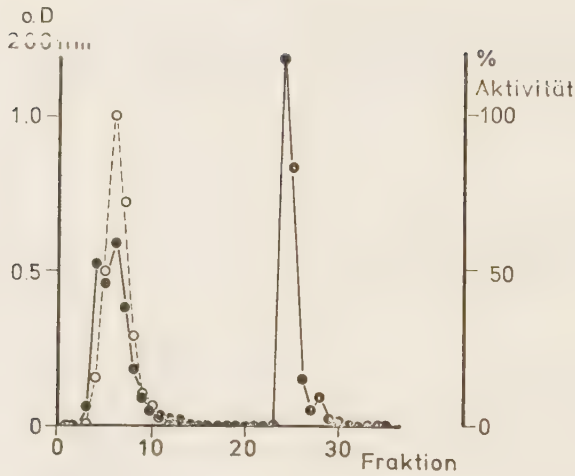


Abb. 8: Hydrophobe Chromatographie der PGAM-A₂ aus Mäuseleber auf Phenyl-Sepharose CL-4B. ●— o.D., ○--- Aktivität

3.3.8 Hydroxylapatitchromatographie

Das Eluat der hydrophoben Chromatographie (3.3.1) wurde 2mal gegen das 20fache Volumen KH_2PO_4 -Puffer, 20 mM, pH 7,0, dialysiert und dann auf eine Hydroxylapatitsäule (9 x 40 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit 9 ml/h; Fraktionsvolumen 4 ml).

Die gebundene PGAM-A₂ wurde mit einem linearen Gradienten von 20 ml KH_2PO_4 , 20 mM und 20 ml KH_2PO_4 , 80 mM, pH 7,0 eluiert (Abb. 9).

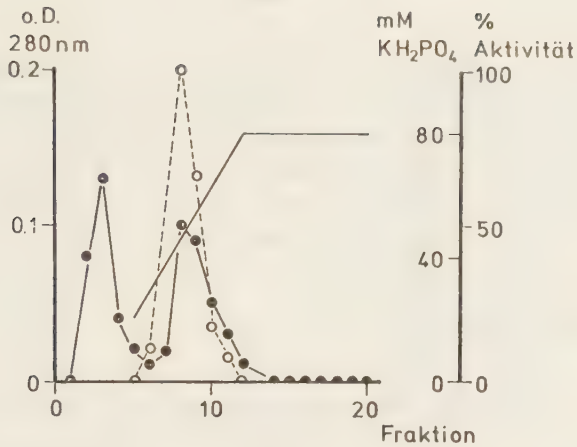


Abb. 9: Hydroxylapatitchromatographie der PGAM-A₂ aus Mäuseleber, ●— o.D., ○--- Aktivität, — Gradient

3.3.9 Gruppenspezifische Affinitätschromatographie über Blaue Agarose

Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen der Hydroxylapatitchromatographie wurden durch Dialyse gegen gesättigte AS-Lösung gefällt. Die Fällung wurde zentrifugiert, das Sediment in TRAP, 20 mM, pH 7,5 gelöst und 2 h gegen 500 ml Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine Blaue Agarose-Säule (5 x 60 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit: 9 ml/h; Fraktionsvolumen: 4,0 ml). PGAM-A₂ bindet nicht an Blaue Agarose (Abb. 10). Die nach 3.3.9 erhaltene Präparation zeigte in der SDS-PAGE zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 28.000 und 56.000. In der nativen Elektrophorese auf Cellogel mit anschließender Coomassie-Anfärbung zeigte die Präparation drei Banden, die auch bei PGAM-spezifischer Aktivitätsanfärbung auftraten. Weitere Banden konnten mit Coomassie-Anfärbung nicht nachgewiesen werden. Um die Frage zu entscheiden, ob die 56.000 D Bande der SDS-PAGE dimerisierte PGAM oder ein anderes, durch native Elektrophorese nicht abzutrennendes Protein war, wurden Gelfiltrationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

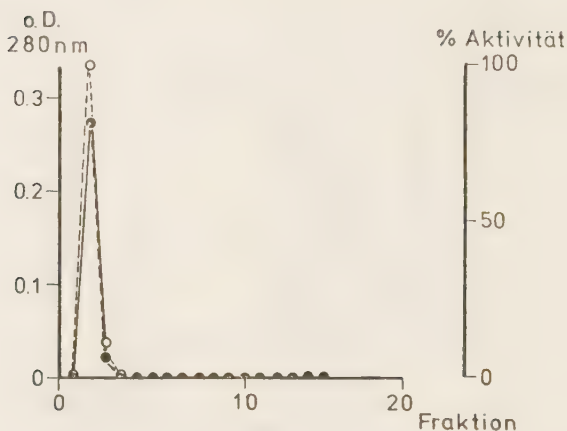


Abb. 10: Gruppenspezifische Affinitätschromatographie auf Blaue Agarose. ●— o.D., ○--- Aktivität

3.3.10 Molekularsiebel-Chromatographie über S-200 sf und LH-20 sf

Die Gelfiltration wurde auf einer Säule mit den Dimensionen 10 x 30 mm (LH-20 sf) und 10 x 460 mm (S-200 sf) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 9 ml/h durchgeführt. Das Fraktionsvolumen war 2,2 ml. Als Puffer wurde Borat, 50 mM, 1 % SDS, 6 M Harnstoff, 1 % Mercaptoethanol, pH 9,0 verwendet. Die beiden Banden konnten auch durch Gelfiltration in denaturierendem Medium nicht getrennt werden

3.4 Isolation der PGAM-A₂ aus Mäusenieren

3.4.1 Gewinnung des Rohextrakts

Es wurde entweder bei -27 °C tiefgefrorenes oder frisches Material verwendet. Die Nieren wurden im Küchenmixer homogenisiert, nach Bestimmung des Gewichts in einem dreifachen Volumen TRIS, 20 mM, pH 8,2 aufgenommen, 2 h gerührt und 60 min bei 39.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung von Fett über Quarzwolle filtriert. Nach einer weiteren Zentrifugation (60 min bei 100.000 g) wurde der Überstand mit festem TRIS auf einen pH von 8,5 (bei 4 °C) eingestellt und auf einen Ionenaustauscher aufgetragen.

3.4.2 DEAE-Cellulose Sephacel

Das Gel wurde in eine Säule (33 x 140 mm) gefüllt und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 120 ml/h gewaschen. Nach Auftragen des Rohextraktes

wurde mit 300 ml TRIS, 20 mM, pH 8,2, 15 mM MgSO_4 gewaschen, bis die Extinktion des Eluats 0,6 war. Die PGAM wurde mit einem linearen Gradienten aus 300 ml TRIS, 20 mM, pH 8,2 bei einer steigenden MgSO_4 -Konzentration von 15 mM bis 150 mM eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit bei der Elution war 120 ml/h (Fraktionsvolumen: 7,5 ml). Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen (Abb. 11) wurden durch Dialyse gegen gesättigte AS-Lösung ausgefällt.

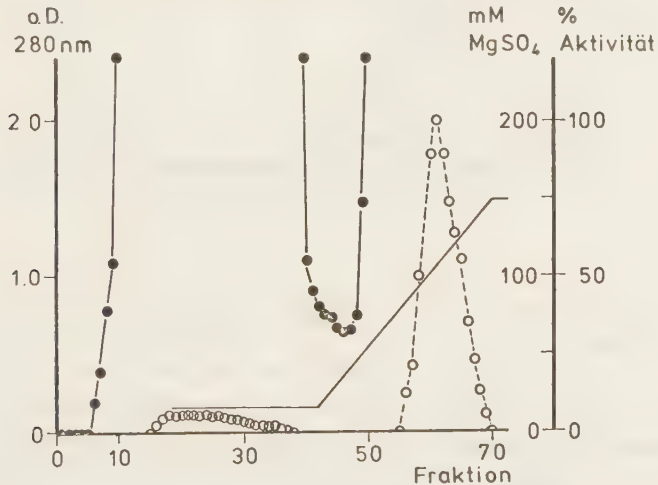


Abb. 11: Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Cellulose. ●— a.D., ○--- Aktivität, — Gradient

3.4.3 Hydrophobe Chromatographie auf Phenyl-Sepharose CL-4B

Die AS-Fällung von 3.4.2 wurde 20 min bei 42.000 g zentrifugiert und das Sediment in TRAP, 100 mM, 950 mM NaCl, pH 7,5 gelöst. Die Lösung wurde auf eine Säule (33 x 40 mm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit: 120 ml/h; Fraktionsvolumen 8 ml).

Die PGAM wurde mit TRAP, 100 mM, pH 7,5, 950 mM NaCl eluiert (Abb. 12). Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Volumen des Pools mit festem Polyethylenglykol eingengt. Wenn der Pool ein Volumen von 10 - 15 ml hatte, wurde die Lösung auf eine G-75 sf Säule aufgetragen.

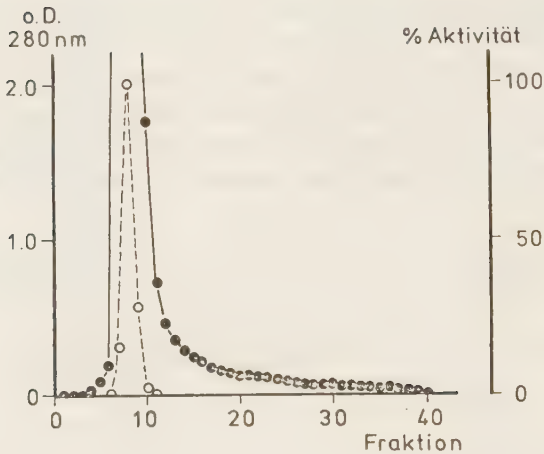


Abb. 12: Hydrophobe Chromatographie auf Phenyl-Sepharose CL-4B. ●— o.D.,
○--- Aktivität

3.4.4 Gelfiltration über G-75 sf und G-15 sf

Die Säulendimensionen waren 39 x 35 mm (G-15 sf) und 39 x 870 mm (G-75 sf), die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h, das Fraktionsvolumen war 10,5 ml. Das Protein wurde mit TRAP, 100 mM, pH 7,5 eluiert. Die PGAM-Aktivität enthaltenden Fraktionen (Abb. 13) wurden vereinigt und gegen TRAP, 20 mM, pH 7,4 dialysiert. Das Volumen des Pools wurde mit Polyethylenglycol eingengt und die Proteinlösung auf eine Blaue Sepharose Säule aufgetragen.

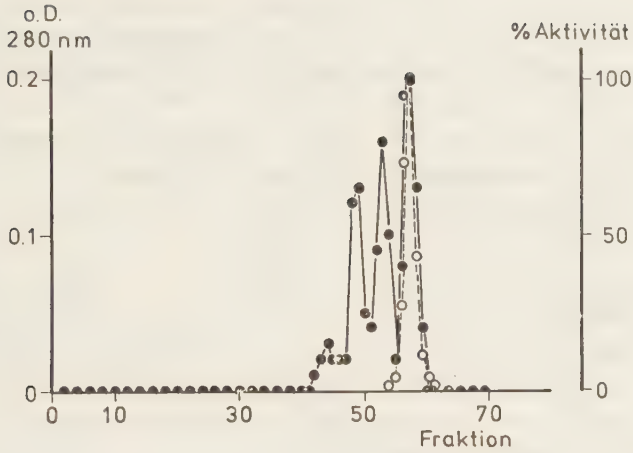


Abb. 13: Gelfiltration auf G-75 sf. ●— o.D., ○--- Aktivität

3.4.5 Affinitätschromatographie auf Blauer Sepharose

Die Säulendimension war 33 x 50 mm, die Durchflußgeschwindigkeit betrug 120 ml/h, das Fraktionsvolumen 8 ml. Die Säule war mit TRAP, 20 mM, pH 7,4 äquilibriert. Die PGAM wurde mit dem gleichen Puffer eluiert (Abb. 14). Die PGAM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Protein durch Dialyse gegen gesättigte AS-Lösung ausgefällt.

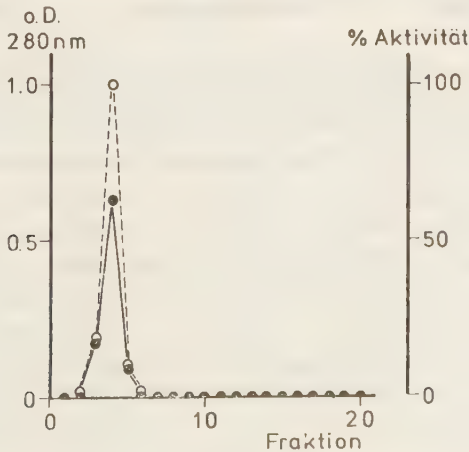


Abb. 14: Affinitätschromatographie auf Blauer Sepharose. ●— o.D., ○--- Aktivität

3.4.6 Hydroxylapatit-Chromatographie

Die AS-Fällung wurde 20 min bei 42.000 zentrifugiert, das Sediment in KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7,4 gelöst und zweimal gegen 500 ml Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine Hydroxylapatitsäule (20 x 150 mm) aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit war beim Beladen der Säule 30 ml/h, eluiert wurde mit 9 ml/h. Das Fraktionsvolumen war 6 ml. Die PGAM wurde durch einen linearen Gradienten von je 100 ml KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7,4 und KH_2PO_4 , 250 mM, pH 7,0 eluiert (Abb. 15).

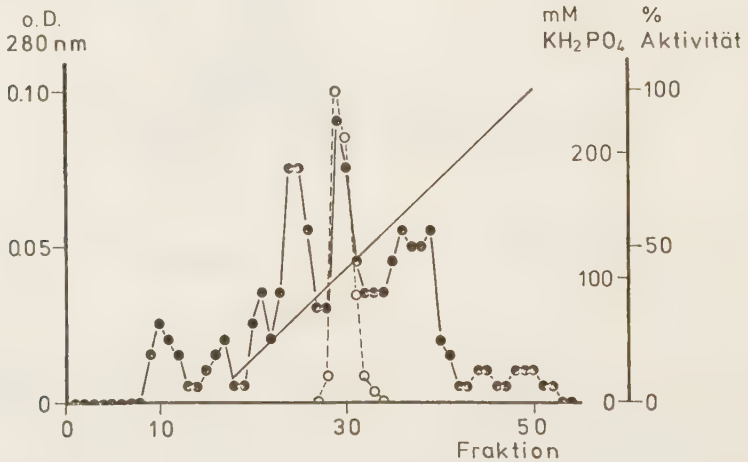


Abb. 15: Hydroxylapatit-Chromatographie. ●— o.D., o--- Aktivität, — Gradient

Die Ergebnisse der Isolierung sind in Tabelle 3 zusammen gefaßt.

Tabelle 3: Übersicht über eine PGAM-Isolierung aus Mäusenieren.

Reinigungsschritt	Aktivität	Protein	Spez. Aktivität	Ausbeute
	U	mg	U/mg	%U
Rohextrakt	3250	950	3,4	100
DEAE-Cellulose	2080	144	14,4	64
Phenyl-Sepharose	1560	45	34,7	48
G-75 sf	1140	12	95,0	35
Blaue Sepharose	950	8,6	110	29
Hydroxylapatit	200	1	200	6

3.5 Physikalische und chemische Eigenschaften

3.5.1 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit der in 2.8 beschriebenen SDS-PAGE.

Als Eichproteine wurden verwendet:

Enzym	MW	Literatur
TPI Kaninchenmuskel	26.500	Darnall und Klotz, 1975
ALD Kaninchenmuskel	40.000	Darnall und Klotz, 1975
PK Kaninchenmuskel	57.200	Darnall und Klotz, 1975
PGK Hefe	47.000	Kuntz und Krietsch, 1982

Folgende Enzyme wurden mit den Eichproteinen verglichen: PGAM-B₂ aus Maus, Kaninchen und Alligator, PGAM-A₂ aus Maus, PGAM aus Bläuhuhn.

Da sich die Laufgeschwindigkeit bei Plattengelen zu den Randfraktionen hin verlangsamt, wäre ein direkter Vergleich nebeneinander liegender Banden ohne Berücksichtigung eines internen Standards unkorrekt. Deshalb enthielten die fünf PGAM zusätzlich PK als Referenzprotein. Nach dem Lauf wurde der Abstand der Proteinbanden von der Auftragsstelle bestimmt und jeweils mit der PK-Referenzbande korrigiert. In einem mittleren Bereich besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Laufgeschwindigkeit der Proteine, d.h. dem gemessenen Abstand von der Auftragsstelle. Trägt man den Logarithmus der MW der Eichproteine gegen den jeweiligen Abstand auf, so können aus der Eichgeraden die unbekannten Molekulargewichte abgelesen werden. Die Molekulargewichte aller Phosphoglyceratmutasen lagen bei 28.000 D.

3.5.2 Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration

Die PGAM-Isozyme wurden in TRAP, 20 mM, 5 mM MgSO₄, pH 7,5 gelöst und 2 h gegen den Puffer dialysiert. Als Testansatz wurde der Vorwärtstest mit doppelter Substratkonzentration verwendet. Die Erhöhung der Ionenstärke im Testansatz erfolgte durch Zugabe eines gleichen Volumens NaCl-Lösung, so daß die Substratkonzentration dem des Standardtests entsprach, die TRA- und die MgSO₄-Konzentration dagegen auf 10 mM, bzw. 2,5 mM erniedrigt wurden. In einem weiteren Ansatz wurde die TRA- und MgSO₄-Konzentration auf 5 mM bzw. 1,25 mM herabgesetzt.

Beide Enzyme zeigten ein sehr schmales Aktivitätsoptimum bei 0 - 50 mM NaCl (Abb. 16).

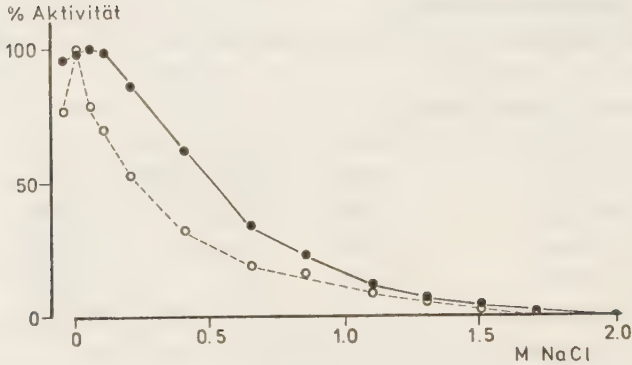


Abb. 16: Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Werte entsprechen einer TRA- und MgSO_4 -Konzentration von 5 mM bzw 1,25 mM ohne Zugabe von NaCl. ●— PGAM-B₂, o--- PGAM-A₂

3.5.3 pH-Optimum

Da die scheinbare pH-Abhängigkeit der PGAM durch die im kompletten Testansatz vorhandenen Enzyme ENO, PK und LDH beeinflusst werden kann, wurde die pH-Abhängigkeit der PGAM-Aktivität über die enzymatische Substratbestimmung ermittelt. Es wurde folgender Testansatz verwendet:

Küvettenkonzentration	
Acetat	24,0 mM
Histidin	16,0 mM
Imidazol	8,0 mM
TRIS	8,0 mM
Glycin	24,0 mM
3PG	16,7 mM
2,3BPG	1,3 mM

In den Testansätzen wurden die entsprechenden pH-Werte eingestellt, die Reaktion wurde mit PGAM gestartet und nach 5 min mit Perchlorsäure gestoppt. Die Reaktion verläuft bei geeigneter PGAM-Konzentration über 5 min linear. Das Reaktionsgemisch wurde mit KOH in 100 mM TRAP neutralisiert und das gebildete 2PG mit dem folgenden Test bestimmt:

Küvettenkonzentration

Imidazol, pH 6,8	79,4 mM
MgSO ₄	7,9 mM
ADP	0,2 mM
NADH	1,3 mM
ENO	2,2 U/ml
PK	5,4 U/ml
LDH	14,4 U/ml

Die Reaktion wurde nach Zugabe von 100 µl neutralisierter Testlösung mit ENO gestartet. Die pH-Optima der untersuchten PGAM liegen zwischen pH 5,5 und pH 7,2 (Abb. 17).

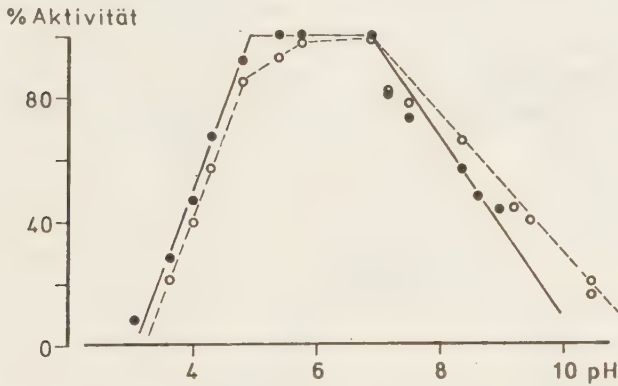


Abb. 17: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert. ●— PGAM-B₂, o--- PGAM-A₂

3.5.4 Temperatur-Optimum

Die Temperatur-Optima der PGAM wurden mit dem Standardtest bestimmt. Der Testansatz wurde in Küvetten pipettiert, im Photometer temperiert und die Temperatur vor jedem Test im Photometer bestimmt. Der Logarithmus der Enzymaktivität wurde gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen. Der zunächst lineare Anstieg der PGAM-Aktivität erreicht für beide Isozyme bei 326 K ein Aktivitätsoptimum (Abb. 18).

Integriert man aus der ARRHENIUS-VAN'T HOFF-Gleichung T_1 und T_2 mit

den dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten K_1 und K_2 , so kann aus der Messung der Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Temperaturen die Aktivierungsenergie berechnet werden (Koblet, H., 1971).

A = Aktivierungsenergie (kJ/Mol Substrat)

$$\text{ARRHENIUS-Gleichung: } A = \frac{\log K_2/K_1 \times T_1 \times T_2}{T_1 - T_2} \times 4,55$$

Für die PGAM wurden folgende Werte bestimmt:

PGAM- A_2 : $A = 58,6$ kJ/Mol Substrat

PGAM- B_2 : $A = 52,3$ kJ/Mol Substrat

Die Aktivierungsenergie war für beide Enzyme im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich groß.

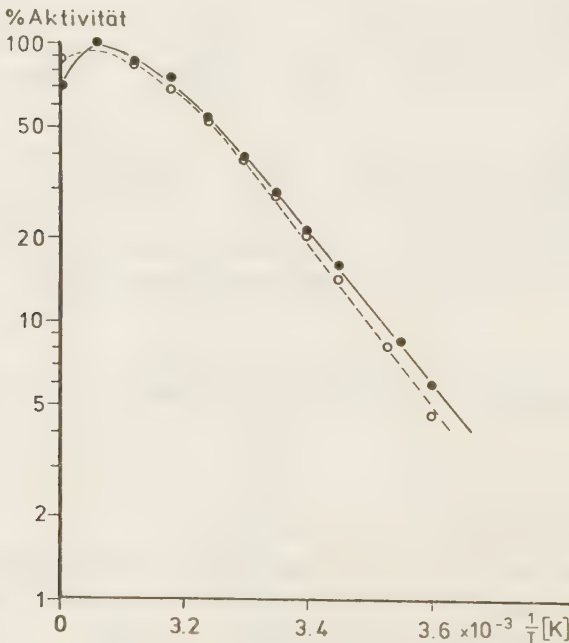


Abb. 18: Temperaturoptima der PGAM- A_2 und - B_2 . ● — PGAM- B_2 , ○ --- PGAM- A_2

3.5.5 pH-Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration wurden die PGAM zwei Stunden gegen pH-Puffer pH 7,0 dialysiert. Aliquots der dialysierten PGAM wurden bei 20 °C 60 min in pH-Puffer, der mit konz. NaOH bzw. konz. HCl auf verschiedene pH- Werte in einem Bereich von 1,0 - 13,0 eingestellt wurde, inkubiert. Die PGAM wurde in Puffer D reaktiviert und danach mit dem Standardtest gemessen. Die Aktivität bei pH 7,0 wurde mit 100 % gleichgesetzt. Beide Enzyme zeigten zwischen pH 6,5 und pH 11,5 noch optimale Stabilität und wurden bei höheren pH-Werten inaktiviert (Abb. 19). Die pH-Stabilitätskurve der PGAM-B₂ zeigte einen zweigipfligen Verlauf. Bei pH 6,5 beginnend, nahm die Stabilität der PGAM-B₂ mit sinkendem pH ab und erreichte bei pH 4,0 einen ersten Tiefpunkt von ca. 12 % Restaktivität. Bei einer weiteren Senkung des pH nahm die Stabilität der PGAM-B₂ wieder zu. Zwischen pH 2 und pH 3 wurden ca. 50 % Restaktivität gemessen. Auch bei Werten unter pH 1 war die PGAM-B₂ nach 60 min Inkubation nicht vollständig denaturiert. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde der Standardtest in Gegenwart von 5 µM Hg⁺⁺, ohne 2,3BPG und ohne 3PG durchgeführt. In allen Fällen wurde keine PGAM-Aktivität beobachtet.

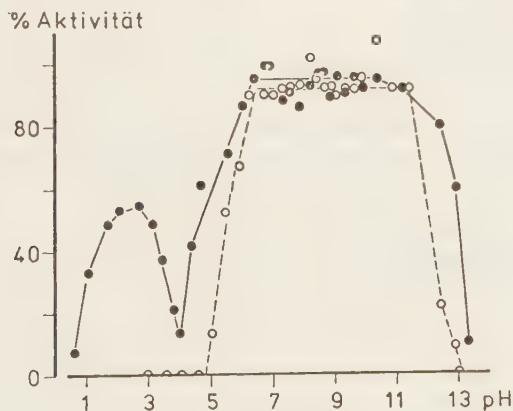


Abb. 19: pH-Stabilität der PGAM-Isozyme. ●— PGAM-B₂, o--- PGAM-A₂

3.5.6 Temperatur-Stabilität

Für die Untersuchung der Temperatur-Stabilität wurden die PGAM 2 h gegen Puffer B dialysiert und in diesem Puffer in einer Konzentration von 5 µM bei 53 und 63 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen,

bei 0 °C 10 min in Puffer D reaktiviert und die Aktivität bestimmt. Die Aktivität bei 25 °C wurde gleich 100 % gesetzt. Der Logarithmus der Restaktivität wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 20).

PGAM-A₂ zeigte bei 53 °C zwei sich überlagernde Reaktionskinetiken. Ein zunächst rascher Aktivitätsabfall in den ersten 20-30 min ging über in einen langsameren linearen Aktivitätsabfall. Durch Differenzbildung der während der ersten 20 min gemessenen Werte mit der aus Kinetik 2 extrapolierten Geraden wurde die Gerade zu Kinetik 1 ermittelt.

Aus den beiden Geraden wurden die Halbwertszeiten für 53 °C bestimmt.

1. Kinetik: $t_{1/2} = 5,5 \text{ min}$

2. Kinetik: $t_{1/2} = 38,5 \text{ min}$

Dagegen zeigte PGAM-B₂ bei der gleichen Temperatur auch nach 120 min Inkubation keinen Aktivitätsabfall.

Nach Zugabe von 2 mM 2,3BPG zeigte auch PGAM-A₂ bei 53 °C nach 120 min Inkubation keinen Aktivitätsabfall.

Bei 63 °C hatte PGAM-A₂ nach 5 min 95 % ihrer Aktivität verloren.

Die Halbwertszeiten für PGAM-A₂ bei 63°C und Zugabe von 2 mM 2,3BPG wurden aus Abb. 21 ermittelt.

1. Kinetik: $t_{1/2} = 11,2 \text{ min}$

2. Kinetik: $t_{1/2} = 57,8 \text{ min}$

PGAM-B₂ zeigte bei 63 °C nicht zwei sich überlagernde Reaktionskinetiken wie PGAM-A₂ bei 53 °C (Abb. 22). Die Halbwertszeiten für PGAM-B₂ bei 63 °C sind:

0 mM 2,3BPG: $t_{1/2} = 51,0 \text{ min}$

2 mM 2,3BPG: $t_{1/2} = 89,9 \text{ min}$

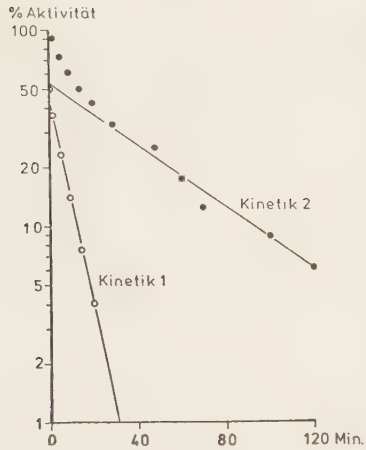


Abb. 20: Abhängigkeit der PGAM-A₂-Aktivität von der Inkubationsdauer bei 53 °C.

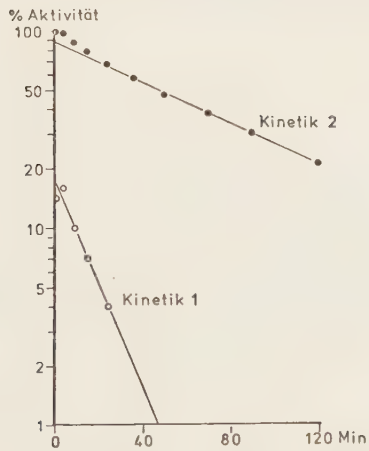


Abb. 21: Abhängigkeit der PGAM-A₂-Aktivität von der Inkubationsdauer bei 63 °C bei Zugabe von 2 mM 2,3BPG

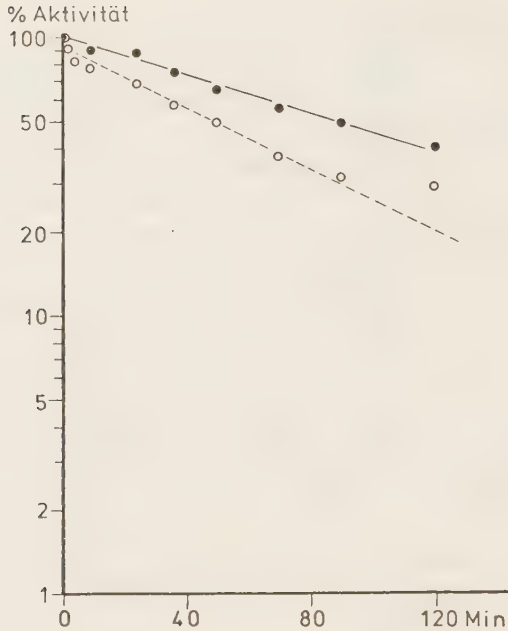


Abb. 22: Abhängigkeit der PGAM-B₂-Aktivität von der Inkubationsdauer bei 63 °C bei Zugabe von 0 und 2 mM 2,3BPG. ●— 2 mM 2,3BPG, o--- 0 mM 2,3BPG

3.5.7 Stabilität in Gegenwart von Schwermetallen

PGAM-A₂ und PGAM-B₂ wurden in einer Konzentration von 5 µM 10 min bei 0 °C in Puffer E mit 0,9-9,1 µM Hg⁺⁺-Ionen inkubiert. Nach 10 min wurden Aliquots aus der Inkubationslösung entnommen, 1:26 in Puffer E, 2 mM EDTA verdünnt und die PGAM-Aktivität bestimmt. In einem weiteren Ansatz wurde PGAM-A₂ und -B₂ in Gegenwart von Uranylacetat inkubiert, beide Isozyme wurden nicht gehemmt.

PGAM-A₂ und -B₂ zeigten unterschiedliche Reaktivität gegenüber Hg⁺⁺-Ionen. Während PGAM-B₂ bei 4,6 µM Hg⁺⁺ nur mehr 1 % Restaktivität zeigte, war PGAM-A₂ auch bei der höchsten Hg⁺⁺-Konzentration noch vollständig aktiv (Abb. 23).

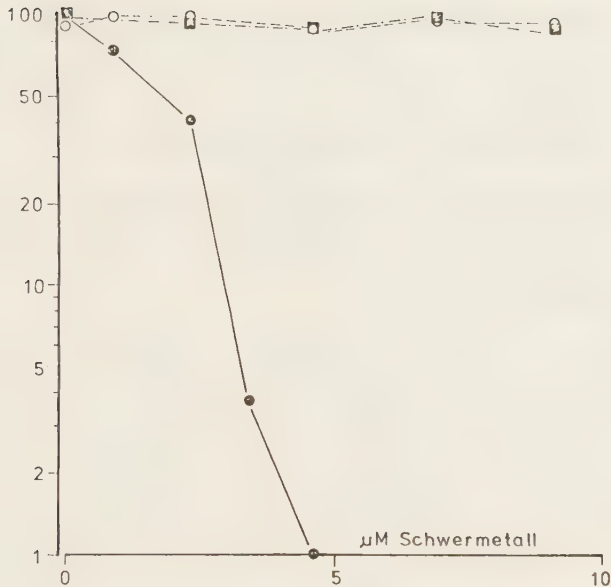


Abb. 23: Schwermetallstabilität der PGAM-Isozyme. ●— PGAM-B₂ in Gegenwart von Hg⁺⁺, ■--- PGAM-B₂ in Gegenwart von UO⁺⁺, ○--- PGAM-A₂ in Gegenwart von Hg⁺⁺ (Die PGAM-A₂-Aktivität in Gegenwart von UO⁺⁺ ist nicht dargestellt.)

Die durch 0,91 mM Hg⁺⁺ inaktivierte PGAM-B₂ wurde nach 10 min Inkubation in Puffer D der 2 mM DTE enthielt reaktiviert.

3.6 Katalytische Eigenschaften

3.6.1 Cosubstratspezifität der PGAM

Die 2,3BPG-Abhängigkeit der Mutasewirkung wurde mit der Hinreaktion untersucht. Bei PGAM-Aktivitäten von 2,7 U/ml (PGAM-B₂) und 1,5 U/ml (PGAM-A₂) (Aktivitätstest mit Cosubstrat) konnte eine geringe, vom Cosubstrat unabhängige Mutasewirkung in 2,3BPG-freiem Testansatz gemessen werden. Die vom Cosubstrat unabhängige Mutasewirkung betrug für PGAM-A₂ und PGAM-B₂ ungefähr 2,0 %.

3.6.2 Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität der PGAM

Um zu untersuchen, ob die PGAM die folgende Reaktion katalysieren können.



Wurde ein Testansatz, bei dem sich das Gleichgewicht der GAPDH-Reaktion einstellt, verwendet.



Die im Reaktionsgleichgewicht vorliegende Konzentration an 1,3BPG reicht aus, um die Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität der PGAM zu testen. Die Meßreaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 400 mM 3PG (Reinheitsgrad I, frei von 2,3BPG) gestartet.

Testansatz:

Küvettenkonzentration

Phosphatpuffer, pH 7,6	42,4 mM
NAD	3,0 mM
GAP	1,2 mM
3PG	14,0 mM
GAPDH	14,0 U/ml

Es wurden folgende PGAM-Aktivitäten eingesetzt:

PGAM-A₂ 5,5 U/ml (Im Standardtest bestimmt)

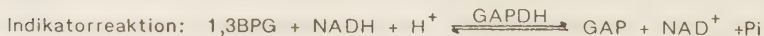
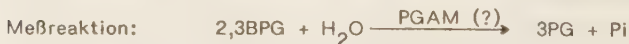
PGAM-B₂ 7,9 U/ml (Im Standardtest bestimmt)

Weder PGAM-A₂ noch PGAM-B₂ zeigten eine meßbare Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität.

3.6.3 Bisphosphatase-Aktivität der PGAM

Die für die PGAM aus verschiedenen Organen beschriebene Phosphatase-Aktivität sollte auch bei den PGAM-A₂ und -B₂ Isozyme der Maus untersucht werden, dabei wird von 2,3BPG der Phosphatrest in 2-Stellung abgespalten und es entsteht 3PG.

Im Folgenden wird das Schema des Phosphatase-Tests dargestellt.



Testzusammensetzung:

Küvettenkonzentration

TRAP. pH 7.6	43.7 mM
MgSO ₄	8.7 mM
NADH	0.2 mM
ATP	3.0 mM
2.3BPG	1.0 mM
PGK	21.0 U/ml
GAPDH	14.0 U/ml

Bei Aktivitäten von 2,7 U/ml (PGAM-B₂) und 1,5 U/ml (PGAM-A₂) in der Küvette konnte keine Phosphataseaktivität nachgewiesen werden. In einem zweiten Versuch wurde dem beschriebenen Testmix 2-Phosphoglycolat in einer Konzentration von 10,9 mM und K₂HPO₄ in einer Konzentration von 5,5 mM zugesetzt, bei konstanten Konzentrationen der anderen Substanzen, mit Ausnahmen von PGAM-A₂, die auf 3,0 U/ml erhöht wurde. Es wurden darauf Bisphosphatase-Aktivitäten gemessen, die 83 ‰ der Mutaseaktivität bei PGAM-B₂ und 23 ‰ der Mutaseaktivität bei PGAM-A₂ ausmachten.

3.6.4 Metallionenabhängigkeit der PGAM

Um den Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf die Aktivitäten der gereinigten PGAM-Isozyme der Maus zu untersuchen, wurde der in 3.5.3 beschriebene PGAM-Test verwendet. Als Testpuffer wurde Imidazol, 100 mM, pH 6,8, verwendet. In verschiedenen Ansätzen wurde dem Puffer 10 mM MgSO₄, 10 mM MnSO₄ und 10 mM EDTA zugegeben. Die PGAM-Isozyme wurden vor dem Test 2 h gegen ein 20faches Volumen TRAP, 100 mM, 2 mM EDTA, pH 6,8 dialysiert. Eine Abhängigkeit von Mangan- bzw. Magnesium-Ionen konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammen gestellt.

Tabelle 4: PGAM-Aktivitäten in % Aktivität bei Anwesenheit/Abwesenheit von Magnesium- und Mangan-Ionen.

	% Aktivität PGAM-A ₂	% Aktivität PGAM-B ₂
Imidazol. 100 mM. pH 6.8	100	100
Puffer + 10 mM MgSO ₄	97.5	102
Puffer + 10 mM MnSO ₄	98.1	97
Puffer + 10 mM EDTA	99.1	102

3.6.5 Substratspezifität der PGAM

Um die Spezifität der PGAM für die Substrate 2PG, 3PG und 2,3BPG zu untersuchen, wurden die C_3 -Verbindungen Glycerol, Glycerol-3-Phosphat, PEP und Pyruvat in einer Konzentration von 5 mM dem Rückwärtstest (2PG-Konzentration in der Küvette = 2,22 mM) zugegeben. Die PGAM wurden in Puffer D reaktiviert. Die Aktivität bei 2,22 mM 2PG ohne andere C_3 -Verbindungen wurde mit 100 % gleichgesetzt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: PGAM-Aktivitäten in % Aktivität bei Zugabe von C_3 -Verbindungen zum Test.

Substanzen	% Aktivität PGAM-A ₂	% Aktivität PGAM-B ₂
Kontrolle	100	100
Glycerol	97,4	97,6
G3P	94,7	95,9
PEP	84,2	51,3
Pyr	86,8	87,8

Von den untersuchten C_3 -Verbindungen hemmt vor allem PEP, in unterschiedlichem Ausmaß, die PGAM-Isozyme.

3.6.6 Spezifische Aktivitäten

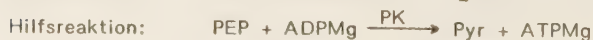
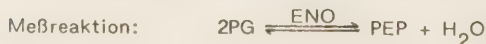
Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden PGAM-Proben, deren Proteingehalt bestimmt worden war, 15 min in Puffer D reaktiviert. Die Enzymaktivitäten wurden mit dem Standardtest bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der PGAM-A₂ war 200 U/mg, die der PGAM-B₂ 510 U/mg.

3.7 Kinetische Eigenschaften

3.7.1 Hemmung durch PEP

Um die Art der Hemmung und die Inhibitorkonstanten K_i bestimmen zu können, wurde bei konstanter PEP-Konzentration die 2PG-Konzentration schrittweise von 0,04 mM bis 2,45 mM erhöht (Abb. 24). Die Konzentrationen für 2PG und PEP wurden enzymatisch bestimmt.

2PG-Bestimmung:



Testansatz:	Küvettenkonzentration
Imidazolpuffer. pH 6.8	84.2 mM
MgSO ₄	8.4 mM
2.3BPG	0.5 mM
ADP	1.0 mM
NADH	0.2 mM
ENO	3.0 U/ml
PK	7.0 U/ml
LDH	20.0 U/ml

Für die PEP-Bestimmung wurde der Test ohne ENO verwendet.

Aus den Abbildung 24 und 25 konnte nach der Formel $K_i = \frac{(1)}{\frac{K_m}{K_{app}} - 1}$

die Inhibitorkonstante berechnet werden.

Die Inhibitorkonstante für PGAM-B₂ ist 1,35 mM ($K_i = 1,23$ mM bei 4,31 mM PEP; $K_i = 1,46$ mM bei 1,08 mM PEP).

Die Inhibitorkonstante für PGAM-A₂ ist $K_i = 7,92$ mM.

Wie die Abbildungen 24 und 25 zeigen, ist die Hemmung durch PEP sowohl für PGAM-A₂ wie für PGAM-B₂ kompetitiv.

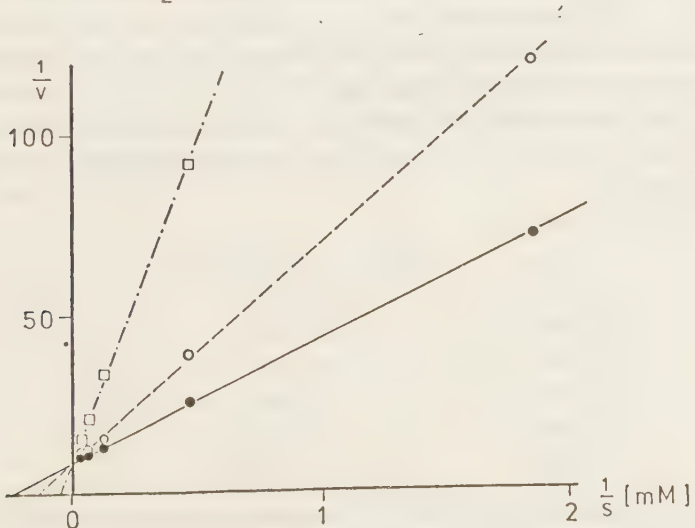


Abb. 24: Doppelt reziproke Darstellung der Hemmung PGAM-B₂ durch PEP. ●--- 0 mM PEP, ○--- 1,08 mM PEP, □--- 4,31 mM PEP

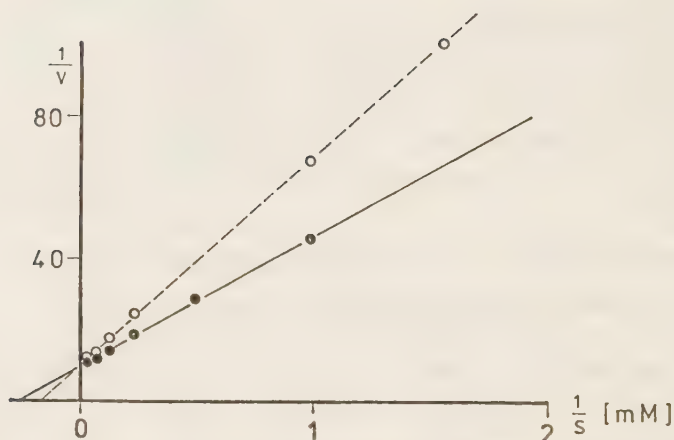


Abb. 25: Doppelt reziproke Darstellung der Hemmung von PGAM-A₂ durch PEP.
 ●--- 0 mM PEP, o--- 4,32 mM PEP

3.7.2 Michaeliskonstanten

Die Michaeliskonstanten für die Substrate der PGAM-Reaktionen wurden durch Zweifach-, oder Vierfach-Bestimmungen gemessen. Aufgetragen wurde $1/v$ gegen $1/S$ (Lineweaver-Burk-Plot). Der Schnittpunkt mit der x'-Achse entspricht $-1/K_m$. Bei allen Messungen wurden PGAM-A₂ und -B₂ in einer Konzentration von 0,03 U/ml in den Test eingesetzt.

Um die K_m für 3PG zu ermitteln, wurden verschiedene 3PG-Konzentrationen in den Standardtest eingesetzt. Die 3PG-Konzentration wurde enzymatisch bestimmt.

Testzusammensetzung:

Küvettenkonzentration'	
TRAP pH 7.0	90,9 mM
MgSO ₄	9,1 mM
NADH	0,2 mM
ATP	3,1 mM
GAPDH	7 U/ml
PGK	41 U/ml

Die Konzentrationen der anderen Substrate wurde gegenüber den im Standardtest beschriebenen nicht verändert. Die 3PG-Konzentrationen wurden in einem Bereich von 7,14–7,14/64 mM variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Es wurden folgende K_m -Werte bestimmt:

PGAM-A₂: $K_m = 0,83 \text{ mM}$ ($n = 2$)

PGAM-B₂: $K_m = 0,52 \text{ mM}$ ($n = 2$)

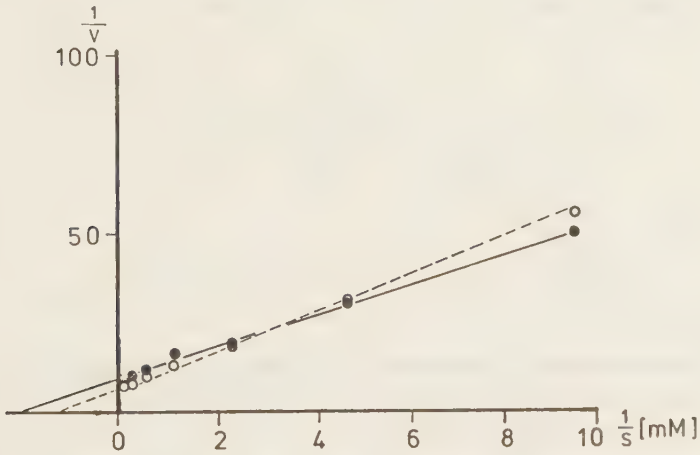


Abb. 26: Lineweaver-Burk-Diagramm. ●— PGAM-B₂, ○--- PGAM-A₂

Die Michaeliskonstanten für 2PG wurden mit dem unter 2.6.1 beschriebenen Rücktest bestimmt. Die 2PG-Konzentrationen wurden enzymatisch bestimmt (3.7.1), sie wurden in einem Bereich von 1,12 bis 1,12/64 mM variiert.

Es wurden folgende K_m -Werte bestimmt (Abb. 27).

PGAM-A₂: $K_m = 0,28 \text{ mM}$ ($n = 4$)

PGAM-B₂: $K_m = 0,24 \text{ mM}$ ($n = 4$)

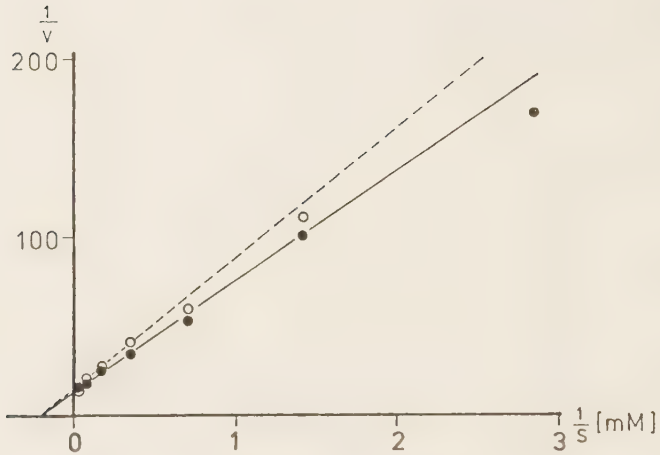


Abb. 27: Lineweaver-Burk Diagramm der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 2PG-Konzentration. ●--- PGAM-B₂, ○--- PGAM-A₂

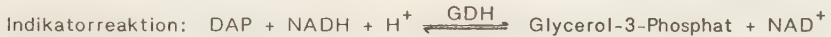
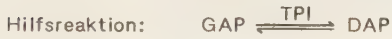
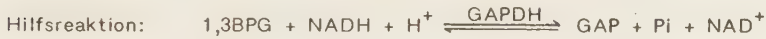
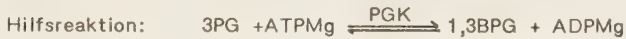
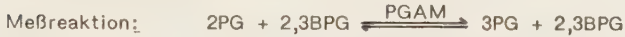
Die Michaeliskonstanten für 2,3BPG wurden ebenfalls im Rücktest bei einer konstanten 2PG-Konzentration von 0,94 mM (enzymatisch bestimmt) und 2,3BPG-Konzentrationen von 1,04-1,04/128 mM gemessen. Die 2,3BPG-Konzentration wurde enzymatisch bestimmt (Michal, 1974).

Testzusammensetzung:

	Küvettenkonzentration
TRAP pH 7,0	44,6 mM
MgSO ₄	8,9 mM
NADH	0,2 mM
ATP	0,6 mM
PGK	35 U/ml
GAPDH	1 U/ml
TPI	78 U/ml
GDH	13 U/ml
PGAM	0,2 U/ml
	47 U/ml
2Phosphoglycolat	0,9 mM

Durch die im Testansatz vorhandenen 0,2 U/ml PGAM werden 2PG-Verunreinigungen vollständig umgesetzt, die natürliche Bisphosphataseaktivität der 0,2 U/ml PGAM ist aber zu gering, um 2,3BPG in einer meßbaren Menge umzusetzen. Dagegen ist die durch 2-Phosphoglycolat induzierte Bisphosphataseaktivität der 47 U/ml PGAM groß genug, um das zu messende 2,3BPG in kurzer Zeit zu spalten.

1. Reaktionsablauf: Entfernung von 2PG-Verunreinigung



2. Reaktionsablauf: 2,3BPG-Bestimmung



Die weiteren Hilfsreaktionen und Indikatorreaktion wurden unter 1. Reaktionsablauf beschrieben.

Es wurden folgende K_m -Werte bestimmt (Abb. 28):

PGAM-A₂: $K_m = 62,5 \mu M$ ($n = 2$)

PGAM-B₂: $K_m = 24,8 \mu M$ ($n = 2$)

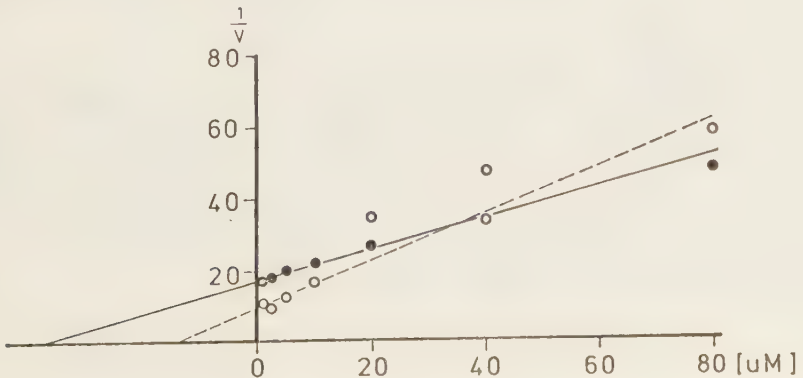


Abb.: 28: Lineweaver Burk-Diagramm der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der 2,3BPG-Konzentration. ●— PGAM-B₂, o--- PGAM-A₂

3.8 Immunologische Untersuchungen

3.8.1 Immunisieren der Tiere

Für die Immunisierung von Kaninchen wurden reine PGAM 10 min bei 30.000 g abzentrifugiert, in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst (Endvolumen 250–400 µl) und die Proteinlösung mit einem gleichen Volumen komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert. Kaninchen wurde bei der ersten Injektion 1 mg Protein mit komplettem Freund'schem Adjuvans intramuskulär verabreicht. Bei der zweiten Injektion, 7 oder 14 Tage nach der ersten, wurde 0,5–1 mg Protein mit inkompletten Freund'schen Adjuvans intramuskulär gegeben. Bei der dritten Injektion, 2–3 Tage nach der zweiten Immunisierung, wurde 0,2 mg Protein intravenös injiziert. Für die dritte Immunisierung wurden die Proteinlösungen gegen sterile, Phosphatgepufferte 0,9%ige NaCl-Lösung dialysiert.

3.8.2 Gewinnung der Seren

Zehn Minuten vor der Blutentnahme wurde den Tieren 1000 I.U. Heparin intravenös injiziert. Zwerghasen wurden dabei und bei der Blutentnahme durch Äthernarkose stillgelegt. Die Blutentnahme erfolgte aus einer Vene, bei Zwerghasen aus einer Arterie, des Ohres. Von einem Kaninchen wurden 10–25 ml Blut abgenommen. Die Blutproben wurden 20 min bei 29.000 g zentrifugiert. Die Immunglobuline wurden durch Dialyse gegen 40%ige Ammoniumsulfatlösung ausgefällt. Von einigen Seren wurden die IgG-Fractionen durch Chromatographie über Protein-A-Sepharose CL-6B isoliert. Die AS-gefällten Immunglobuline und die IgG wurden als Ammoniumsulfatsuspensionen, nicht verarbeitete Seren gefroren bei -27 °C aufbewahrt. Mit der beschriebenen Methode wurden Antikörper gegen die PGAM-B₂ von Maus und Alligator, nicht aber gegen PGAM-A₂ der Maus gewonnen.

3.8.3 Kreuzreaktivität der Antikörper

Um festzustellen, ob Anti-PGAM-B₂-Antikörper der Maus mit PGAM-A₂ der Maus reagieren, wurde die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony verwendet, weil das Vorliegen präzipitierender, aber nicht hemmender Antikörper erkannt wird und die Anordnung der Präzipitationslinien auf den Ouchterlonyplatten zum Vergleich der antigenen Determinanten der Proteine verwendet werden kann.

Resultate: Anti-PGAM-B₂ reagiert nicht mit PGAM-A₂

3.9 Phylogenie der PGAM-Isozyme

3.9.1 Elektrophoretische Untersuchungen (nach Klassen geordnet)

3.9.1.1 Säuger (Mammalia)

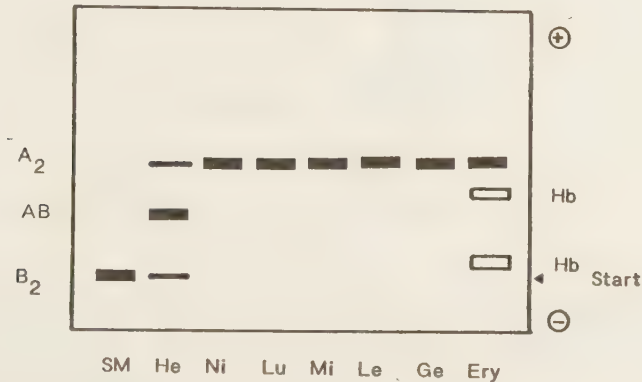


Abb. 29: PGAM-Elektrophoresen von Organen des Hausschweins (Abkürzungen: SM = Skelettmuskel, He = Herzmuskel, Ni = Niere, Lu = Lunge, Mi = Milz, Le = Leber, Ge = Gehirn, Ery = Erythrozyten, Hb = Hämoglobin)

Bei allen adulten Säugern wurde im Skelettmuskel nur die der PGAM-B₂ entsprechende Isozymbande beobachtet (Abb. 29). In Niere, Lunge, Milz, Leber, Gehirn und Erythrozyten wurde von Schwein, Katze und Kaninchen nur die PGAM-A₂-Isozymbande gefunden. In der Niere der Maus konnten neben der PGAM-A₂ auch die PGAM-B₂ und das Heterodimer PGAM-AB immer nachgewiesen werden. Die B₂ und AB Isozymbanden waren deutlich schwächer als die A₂-Bande. Eine quantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt. Die bei den Säugern beobachtete Verteilung der Isozyme wird im folgenden als "konservativ" bezeichnet.

Die Isozymmuster der Herzmuskeln sind in Abb. 30 dargestellt.

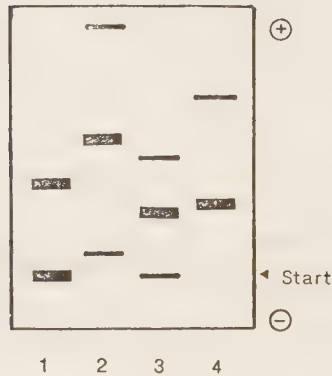


Abb. 30: Verteilung der PGAM-Isozyme in Herzmuskelextrakten von vier Säugern aus vier verschiedenen Ordnungen (1: Katze, Ordn. Carnivora; 2: Kaninchen, Ordn. Lagomorpha; 3: Hausschwein, Ordn. Artiodactyla; 4: Maus, Ordn. Rodentia)

3.9.1.2 Vögel (Aves)

In allen Geweben der Arten Kohlmeise, Sperling (Ordn. Passeriformes); Haustaube (Ordn. Columbiformes); Stockente (Ordn. Anseriformes); Haushuhn (Ordn. Galliformes); Wellensittich (Ordn. Psittaciformes) wurde, auch bei starker Anfärbung, nur eine einzige Isozymbande beobachtet (Abb. 31). Dagegen fand man bei der Elektrophorese von Gewebeextrakten eines Bläßhuhns (Ordn. Gruiformes, Fam. Rallidae) Isozyme (Abb. 32).

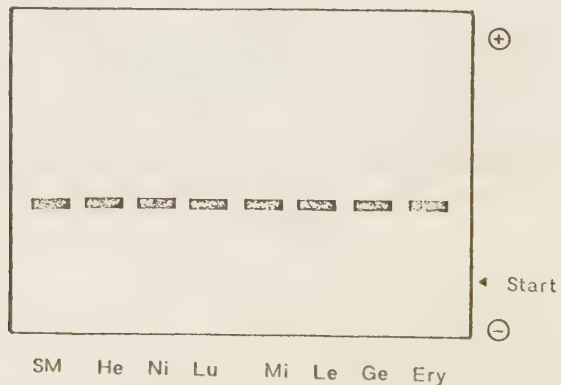


Abb. 31: PGAM-Elektrophoresen von Organen der Stockente (Abkürzungen wie Abb. 29)

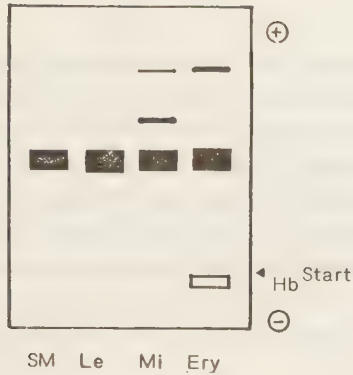


Abb. 32: PGAM-Elektrophorese von Organen des Bläbuhns

Bei starker Anfärbung waren in der Milz zwei, in Erythrozyten eine zusätzliche PGAM-Aktivitätsbande zu sehen. Die anderen routinemäßig untersuchten Organe (in Abb. 32 nicht gezeigt) besaßen nur eine Aktivitätsbande mit der Wanderungsgeschwindigkeit von Muskel- und Leber-PGAM.

3.9.1.3 Reptilien (Reptilia)

Bei Dreikielschildkröte (Ord. Chelonia), Alligator (Ord. Crocodilia) und Hausgecko (Ord. Squamata) traten drei Isozyme auf (Abb. 33).

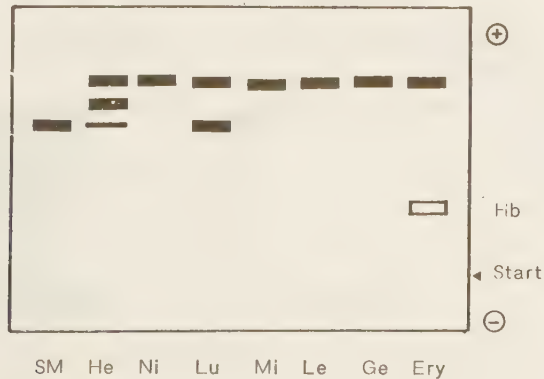


Abb. 33: PGAM-Elektrophoresen von Organen der Dreikielschildkröte

Wie bei den Säugern tritt im Skelettmuskel der Reptilien nur eine langsam wandernde Bande auf. Im Herzmuskel von Schildkröte und Alligator wurden intensive A_2 - und AB-Banden beobachtet, im Herzmuskel des Geckos war dagegen neben einer intensiven B_2 -Bande nur eine schwächere AB-Bande sichtbar. Mit zwei Ausnahmen zeigten Niere, Lunge, Milz, Leber, Gehirn und Erythrozyten nur die A_2 -Bande. In der Lunge der Dreikielschildkröte wurden gleich intensive A_2 - und B_2 -Banden beobachtet. Das Heterodimer wurde auch bei intensiver Anfärbung nicht sichtbar. In der Niere des Geckos wurden die A_2 - und die B_2 -Bande mit gleicher Aktivität angefärbt. Das Heterodimer war nur schwach sichtbar.

3.9.1.4 Amphibien (Amphibia)

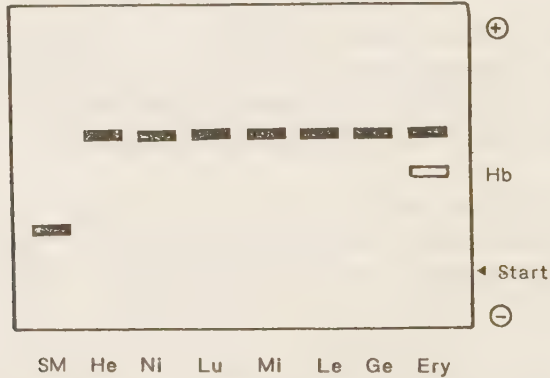


Abb. 34: PGAM-Elektrophoresen von Organen des Wasserfroschs

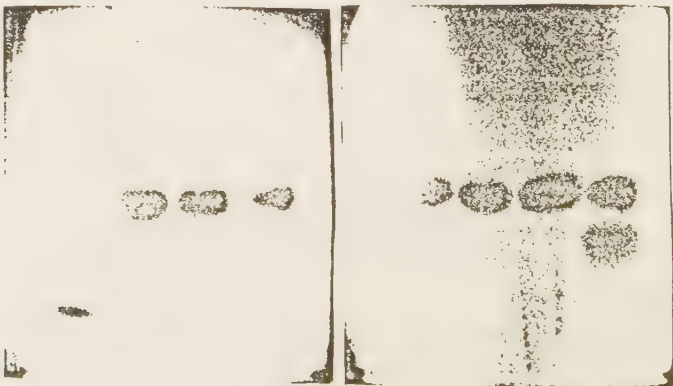


Abb. 35: PGAM-Elektrophoresen vom Wasserfrosch (entspricht Abb. 34)

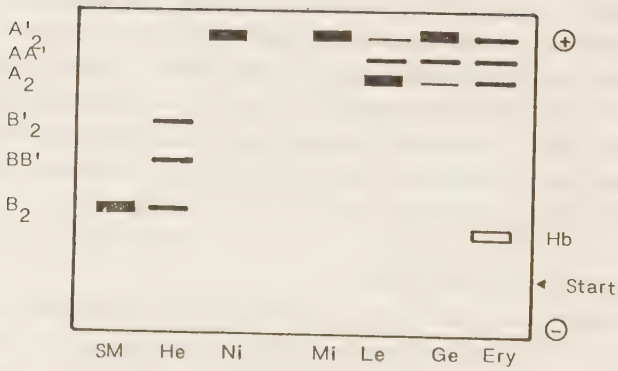


Abb. 37: PGAM-Elektrophoresen von Organen einer Brachse

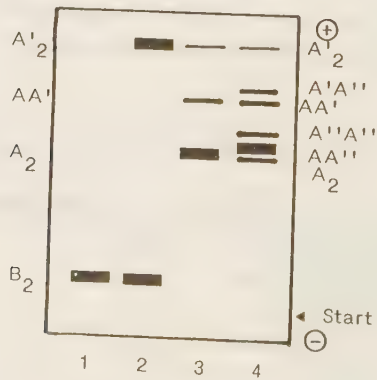


Abb. 38: Verteilung von PGAM-Isozymen in Muskel (1), Herz (2) und Gehirn (3, 4) von zwei Regenbogenforellen. Die Isozymverteilung in Muskel und Herz war bei beiden Tieren identisch.

3.9.1.6 Knorpelfische (Chondrichthyes)

Abweichend von allen anderen Vertebraten wurde im Gehirn vom Katzenhai (*Scyliorhinus caniculus*, Fam. Scylliidae) und Dornhai (*Squalus acanthias*, Fam. Squalidae) neben den von Knochenfischen, Amphibien, Reptilien und Säugern bekannten Isozymen, ein viertes, schnell zur Anode wanderndes Isozym beobachtet (Abb. 39). Außerdem war die Gewebeverteilung der PGAM-Isozyme bei den Haien unterschiedlich von der der anderen Vertebraten. In den Organen Skelettmuskel und Leber trat nur das PGAM-B₂ Isozym auf, das auch in Milz und Erythrozyten das vorherrschende Isozym war. Nur in den Organen Gehirn und Herz färbte PGAM-A₂ stärker als PGAM AB oder PGAM-B₂ an (Abb. 39).

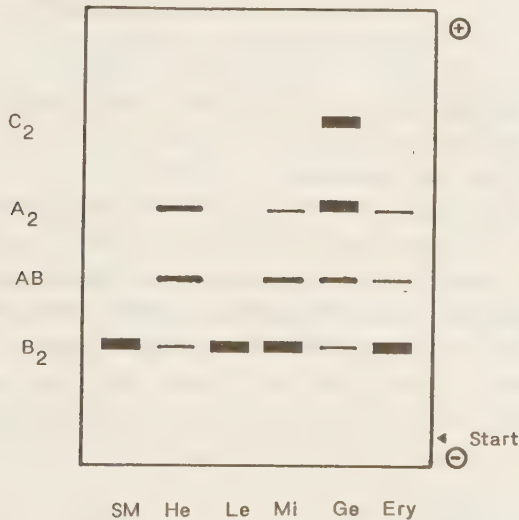


Abb. 39: PGAM-Elektrophorese von Organen eines Katzenhais

3.9.1.7 Rundmäuler (Cyclostomata)

Bei den zur Ordnung Petromyzonta gehörenden Neunaugen wurde nur ein Isozym beobachtet (Abb. 40).

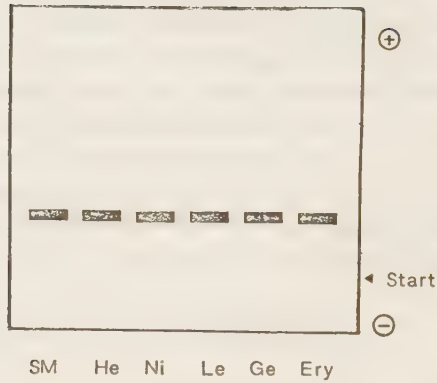


Abb. 40: PGAM-Elektrophoresen von Organen eines Flußneunauges

3.9.2 Immunologische Untersuchungen

3.9.2.1 Doppelimmundiffusion-Tests mit Anti-PGAM-B₂-Antikörpern vom Kaninchen

Es wurden die Muskelextrakte von Ratte, Rind, Schwein, Kaninchen, Katze, Huhn, Alligator, Forelle und Mensch untersucht, nur bei Rattenmuskel wurde ein Präzipitat sichtbar. Bei alternierender Anordnung von Ratten- und Mäusemuskel in den peripheren Löchern des Gels bildeten sich ineinander übergehende Präzipitationslinien, was auf eine Identität der antigenen Determinanten schließen läßt.

3.9.2.2 Doppelimmundiffusion-Tests mit Anti-Alligator-PGAM-B₂-Antikörpern vom Kaninchen

Es wurden die Muskelextrakte von Rind, Huhn, Bleßhuhn, Spatz, Gecko, Aga, Forelle und Flußneunauge untersucht.

In keinem der Ansätze konnten Präzipitationslinien festgestellt werden. Auch die PGAM-A₂ der Alligatorleber zeigte keine Kreuzreaktivität.

3.10 Ontogenie und Gewebespezifität der PGAM-Isozyme in der Maus

3.10.1 Gewebespezifität

Spermien aus dem Nebenhoden von C3H-Mäusen wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge (Typ 4123 mit Ausschwingrotor 040) 20 min bei 4470 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 0,9%iger NaCl-Lösung vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschgang wurde dreimal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Spermien in Puffer D aufgenommen und im Eisbad dreimal für ca. 0,5 s mit einem Branson-Sonifier mit Mikrotip, Stufe 2, beschallt. Alle Präparationsschritte wurden bei 25 - 30 °C durchgeführt.

Mäusefibroblasten wurden aus einer weiblichen C3H/Aa gewonnen. Das Tier wurde durch Genickbruch getötet, in 70%igen Alkohol getaucht und geöffnet. Stücke des Peritoneums wurden in F10-Medium mit 15 % FCS, 10.000 I.U. Penicillin/100 ml, 10 mg Streptomycin 100/100 ml und 250 µg Fungizone/100 ml gewaschen, mit der Schere zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen (90 mm d) mit F10/15% FCS transferiert. Wenn die Platten konfluent bewachsen waren, wurden sie ca. 20 min mit 2,5%igen Trypsin bei 37 °C abgelöst und 10 min bei 700 g zentrifugiert. Die Fibroblasten wurden in Puffer D suspendiert und im Eisbad durch Beschallen lysiert.

Von den 18 untersuchten Geweben zeigten Skelettmuskel, Herzmuskel, Hoden, Nebenhoden und Spermien PGAM-B₂-Aktivität (Abb. 41).

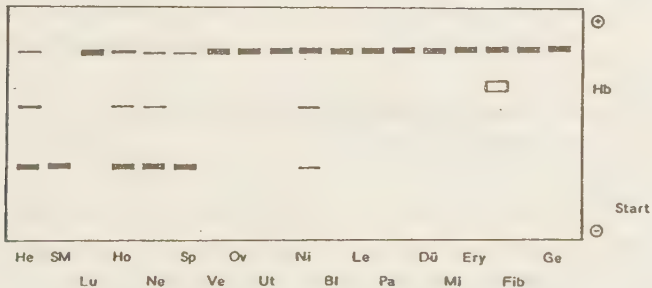


Abb. 41: Verteilung der PGAM-Isozyme in Geweben der Maus (Ho = Hoden, Ne = Nebenhoden, Sp = Spermien, Ve = Vesikeldrüse, Ov = Ovar, Ut = Uterus, Bl = Blase, Pa = Pankreas, DÜ = Dünndarm, Fib = Fibroblasten, Hb = Hämoglobin)

3.10.2 PGAM-Isozymverteilung in den Präimplantationsstadien der Maus

In allen Präimplantationsstadien (Zygoten, 2-Zellstadien, Morulae, Blastocysten, Eizylinder) wurde nur das PGAM-A₂-Isozym beobachtet.

3.10.3 PGAM-Aktivität in frühen Embryonalstadien der Maus

Wie aus Abb. 42 und Tab. 6 hervorgeht, erfolgt zunächst eine Reduktion der PGAM-Aktivität bei der Entwicklung vom unbefruchteten Ei zum Zweizellstadium. Zygoten wurden nicht getestet. Vom Tag 2 bis Tag 4 steigt die Aktivität wieder langsam an. Eine deutliche Zunahme der Aktivität erfolgt erst nach der Implantation (Tab. 6).

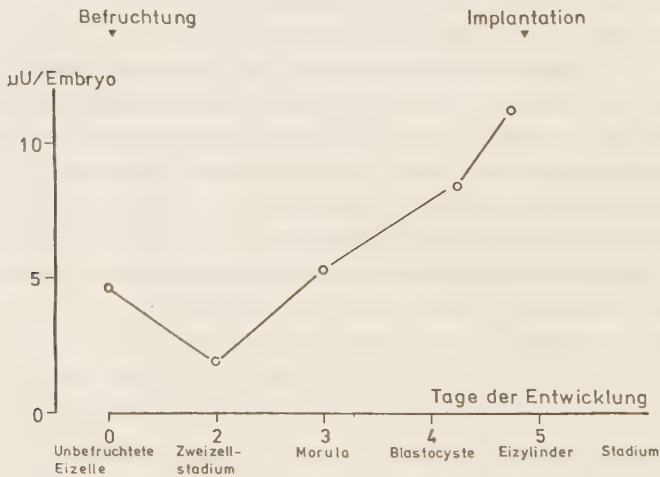


Abb. 42: PGAM-Aktivitäten in der Embryogenese der Maus

Tabelle 6: PGAM-Aktivitäten in frühen Embryonalstadien der Maus

Stadium	Aktivität $\mu\text{U/Embryo}$ +Standartabweichung	Embryonen n	Tests n
Eizelle unbefruchtet	4,56 $\pm$ 0,41	39	5
2-Zellstadium	1,85 $\pm$ 0,39	35	4
Morula	5,32 $\pm$ 1,93	44	5
Späte Blastocyste	8,44 $\pm$ 1,91	34	5
Eizylinder Tag 5	11,2 $\pm$ 6,20	18	5
Eizylinder Tag 6	1060	2	2

3.11 Genetische und cytogenetische Untersuchungen

3.11.1 Screening nach elektrophoretischen Varianten

Mit Hilfe von elektrophoretischen Varianten können Proteine bestimmten Kopplungsgruppen zugeordnet werden. Da Pgam-2 bisher noch keiner Kopplungsgruppe zugeordnet wurde und von Pgam-I nur die Lage auf Chromosom 19 bekannt ist, wurden verschiedene Mäusestämme nach elektrophoretischen Varianten der PGAM-Isozyme untersucht. Für die Elektrophorese wurden Leber- und Skelettmuskelextrakte verwendet.

Es wurden folgende Laborstämme untersucht:

AKR, BALB/c, CBA, DBA/2, C3H/He, C3H/Aa, C57Bl/6J, I, NMRI, 101, 129, Peru/Coppock 1Fr, Peru/Coppock 6Fr, QQ1, T138, KD, T02, B10, STU

Neben Mus musculus domesticus wurden Tiere der Art Mus spretus, der Unterart Mus musculus molossinus und Hybriden aus Mus musculus musculus und Mus musculus domesticus aus Dänemark untersucht. Außerdem wurden 26 Wildmäuse untersucht, die in der Großmarkthalle in München gefangen wurden.

Es wurde in keinem Fall eine elektrophoretische Variante entdeckt.

3.11.2 Gen-Dosis-Effekt

Es wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe von Gen-Dosis-Untersuchungen den Genort von Pgam-2 einem Chromosom zuzuordnen. Dazu wurden Elektro-

phoresen von foetalen Herzen (Trisomien und Kontrollen) quantitativ ausgewertet. Gen-Dosis für die B-Untereinheit würde zu einer Verschiebung des Isozymmusters im Pherogramm führen. In Abb. 43 wird dieser Effekt bei Ts 19 für Pgam-1 und die A-Untereinheit der PGAM gezeigt.

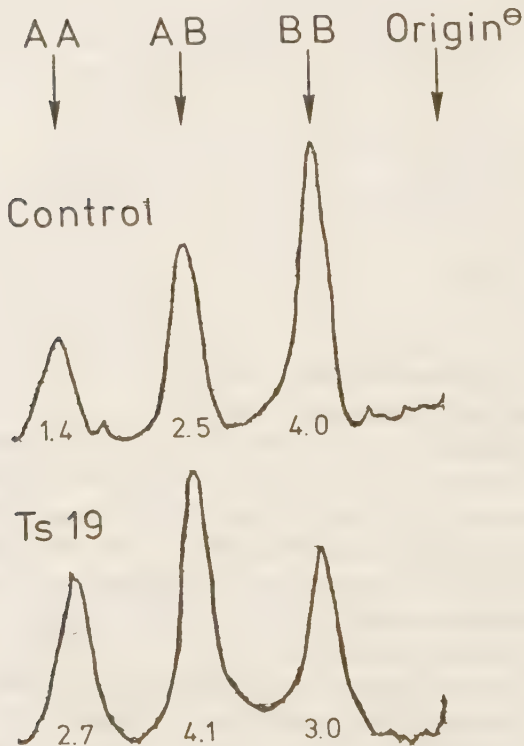


Abb. 43: Quantitative Auswertung von PGAM-Elektrophoresen aus Herzen einer Ts 19 und einer Kontrolle (aus Bücher et al., 1980)

Bei den untersuchten Trisomien Ts 12, Ts 14, Ts 16 und Ts 18 konnte keine Verschiebung des Isozymmusters gefunden werden.

4. DISKUSSION

4.1 PGAM-Isolierungen

Mit dem beschriebenen Verfahren konnten für alle Untersuchungen ausreichende Mengen an reiner PGAM-B₂ der Maus gewonnen werden.

Die einmalige Aufarbeitung einer größeren Menge Mäusemuskel und die Aufbewahrung der PGAM-B₂ enthaltenden Fraktionen als Ammoniumsulfatsuspension erschien sinnvoll, weil die Gefahr einer Modifikation oder eines Abbaus durch Proteasen in der Ammoniumsulfatsuspension im Vergleich zum gefrorenem Muskel gering war und außerdem die Aliquots einer Ammonsulfatsuspension im Vergleich zu kleineren Mengen an gefrorenen Mäusemuskel sich schneller weiter verarbeiten lassen.

Als zweiter Präparationsschritt wurde die Affinitätselutions-Chromatographie eingeführt. Mit dieser Methode wurden bereits Proteine in einem "Ein-Schrittverfahren" mit guten Ausbeuten bei geringem technischen Aufwand isoliert (Scopes, 1977). Bei diesem Verfahren wird das zu isolierende Protein unspezifisch an einen geeigneten Ionenaustauscher gebunden, das gebundene Protein wird dann mit einem seiner Substrate, das die gleiche Ladung wie der Ionenaustauscher aufweist, spezifisch eluiert.

Diesem Verfahren sind in der Praxis Schranken gesetzt. Da die Mehrzahl der Enzyme (z.B. alle Glykolyseenzyme) negativ geladene Substrate besitzen, muß ein Kationenaustauscher verwendet werden, damit das Protein durch ein negativ geladenes Substrat eluiert werden kann. Von den PGAM-Isozymen der Maus sind bei physiologischen pH-Werten alle negativ geladen, d.h., auch PGAM-B₂ bindet nur im sauren Milieu an einen Kationenaustauscher. Viele Proteine (u.a. PGAM-A₂ der Maus, PGAM-B₂ des Alligators, PGAM des Bläßhuhns) werden in dem pH-Bereich, in dem sie an einen Kationenaustauscher binden, bereits denaturiert (Scopes, 1982).

In Vorversuchen wurden die Kationenaustauscher Phosphocellulose, SP-Sephadex C-50, CM-Sephadex und CM-Sephadex geprüft. Von diesen zeigte CM-Sephadex C-50 die besten Bindungseigenschaften für PGAM-B₂. Mit CM-Sephadex C-50 wurden auch die besten Ausbeuten erzielt. Interessant ist, daß unter identischen Bedingungen keine Bindung der PGAM-B₂ an SP-Sephadex erfolgte. Phosphocellulose erwies sich als ungeeignet, weil die Phosphocellulosen verschiedener Firmen (Pharmacia, Sigma,) und verschiedene Lieferungen einer Firma teilweise völlig unterschiedliche Eigenschaften hatten.

Von den bei einem pH-Wert von 6,0 + 0,5 puffernden Substanzen stabilisierte Kakodylat bei Zugabe von DTE die PGAM-B₂. Obwohl Kakodylat toxisch ist und bei Zugabe von DTE das giftige Gas AsH(CH₃)₂ entsteht, wurde Kakodylat als Puffer für die Affinitätselutionschromatographie verwendet.

Um eine nichtspezifische Elution von Fremdprotein auf Grund der Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von Substrat bei der Affinitätselution zu vermeiden, führte SCOPES (Scopes, 1977) einen "dummy substrate wash" ein, d.h., vor der Elution mit Substrat wird mit Neutralsalz einer entsprechenden Ionenstärke gewaschen. Dieses Verfahren erwies sich bei der Affinitätselution der Mäuse-PGAM-B₂ als ungeeignet. Es wurden bei Elution mit 1 mM 2,3BPG neben PGAM-B₂ immer zwei Fremdproteine spezifisch mitelutiert, eines davon war Fructose-1,6-bisphosphataldolase. Mit zwei weiteren Schritten, Molekularsiebchromatographie und DEAE-Sephrose-Ionenaustauschchromatographie, konnte eine reine Mäusemuskel-PGAM dargestellt werden, so daß die Gesamtpräparation aus fünf Schritten bestand: Rohextrakt - Ammoniumsulfatfällung - Affinitätselution auf CM-Sephadex C-50 - Molekularsiebchromatographie auf Sephacryl S-200 sf - Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephrose CL-6B.

In den in letzter Zeit erschienenen Arbeiten wurden Muskelphosphoglyceratmutasen aus folgenden Organismen isoliert:

Kaninchen (Scopes und Stoter, 1982) Es wurde ein Drei-Schritt-Verfahren, bestehend aus Herstellung des Rohextrakts, fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Affinitätselution auf Phosphocellulose beschrieben. Die Ausbeute betrug 40 %, die spezifische Aktivität 1000 U/mg Protein.

Huhn (Petell, Killion und Lebherz, 1982) Von diesen Autoren wird ebenfalls ein Drei-Schritt-Verfahren, Rohextrakt, Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie mit Elution durch abgestufte Salzkonzentrationserhöhung beschrieben. Die Autoren geben an, auf diese Art die Enzyme PGAM, CPK, ENO, ALD und GAPDH rein dargestellt zu haben. Die spezifische Aktivität der PGAM war 295 U/mg, die Ausbeute 19 %.

Schwein (Kulbe, Foellmer und Fuchs, 1982). Hier wurde ein Fünf-Schritt-Verfahren beschrieben, bestehend aus Gewinnung des Rohextrakts, Sephadex G-100 Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex A-50 und Hydroxylapatitchromatographie. Mit diesem Verfahren erzielten die Autoren eine Ausbeute von 28 % und spezifische Aktivitäten von 340 U/mg Protein.

Schwein (Bartrons und Carreras, 1982). BARTRONS und CARRERAS verwendeten für ihre Enzymisolierung den Herzmuskel des Schweines und konnten so alle drei PGAM-Isozyme isolieren. Die Autoren beschreiben ein Sechs-Schritt-Verfahren bestehend aus Gewinnung des Rohextraktes, fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, Sephadex G-100 Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex A-50, Hydroxylapatitchromatographie und mit Affinitätschromatographie über Blaue Sepharose. Die Isozyme wurden durch sukzessive Elution auf Blauer Sepharose getrennt. Die Bindung der PGAM-Isozyme des Schweins an Blaue Sepharose erscheint interessant, weil es nie gelang, PGAM-A₂ oder -B₂ der Maus an Blaue Sepharose oder Blaue Agarose zu binden. Die Autoren erzielten Ausbeuten von 1 %, 5 % und 4 % für PGAM-A₂, PGAM-AB und PGAM-B₂ mit spezifischen Aktivitäten von 309, 352 und 392 U/mg Protein.

Für PGAM-B₂ der Maus wurde bei einer Ausbeute von 17 % eine spezifische Aktivität von 510 U/mg Protein erzielt. Ausbeuten (4-40 %) und spezifische Aktivitäten (295-1000 U/mg) der in der Literatur beschriebenen Isolierungen von Muskel-PGAM variieren beträchtlich. Es kann nicht entschieden werden, ob diese Unterschiede auf präparationsbedingte Artefakte bzw. auf spezifische Eigenschaften der Proteine zurückzuführen sind.

Da die Muskel-PGAM des Alligators im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur zur Gewinnung von Antikörpern dienen sollte, wurde nicht sehr schonend gearbeitet. Es gelang, das Enzym mit einem Sechs-Schritt-Verfahren, Gewinnung des Rohextraktes, fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex A-50 im Batch-Verfahren, Gelfiltrationschromatographie auf DEAE-Sepharose CL-6B und Hydroxylapatitchromatographie rein zu erhalten. Die Affinitätselutions-Chromatographie konnte nicht eingesetzt werden, weil Alligatormuskel-PGAM bereits denaturiert oder inaktiviert wird, bevor sie an den Kationenaustauscher bindet. Aus dem gleichen Grund konnte diese Methode auch bei der Isolierung der PGAM-A₂ der Maus nicht angewandt werden. Der erste Präparationsschritt nach Gewinnung des Rohextraktes, die Ammoniumsulfatfällung, wurde aus den oben beschriebenen Gründen durchgeführt. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß beim folgenden Präparationsschritt hohe Aktivitätsverluste (85-90 %) auftraten, unabhängig vom verwendeten Gel, pH-Wert und Ionenstärke des Puffers. Es zeigte sich, daß diese Aktivitätsverluste durch einen Hitzeschritt bei gleichzeitiger 2,3BPG-Substratprotektion vermieden werden konnten. Der Hitzeschritt wurde deshalb trotz Bedenken in den Trennungsgang eingeführt, da Proteine durch hohe Temperaturen modifiziert

werden können (persönliche Mitteilung Krietsch, Wachter).

In weiteren Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Ionenaustausch-Chromatographie über CM-Sephadex C-50 im Batch-Adsorptionsverfahren gefolgt von der Ionenaustauscherchromatographie über DEAE-Sephacel CL-6B keinen nennenswerten Reinigungserfolg zeigte, verglichen mit einer Austauschchromatographie nur über DEAE-Sephacel. Da DEAE-Sephacel ein sehr teures Material ist und nicht unbegrenzt regeneriert werden kann, wurde der CM-Sephadex Präparationsschritt dennoch beibehalten, weil durch diesen Schritt Verunreinigungen abgetrennt wurden.

Bei den weiteren Schritten des Trennungsganges, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephacel CL-6B, Gelfiltration auf G-75 sf, Hydrophobe Chromatographie auf Phenyl-Sephacel CL-4B, Hydroxylapatit-Chromatographie und Gruppenspezifische Affinitätschromatographie auf Blauer Agarose wurde die PGAM-A₂ soweit gereinigt, daß in der SDS-PAGE nur noch eine Proteinbande neben der PGAM-A₂-Bande zu sehen war. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die Proteine voneinander abzutrennen. Eine Chromatographie auf Octyl-Sephacel CL-4B war unergiebig, weil PGAM-A₂ und das unbekannte Protein auch mit einem 1:1 Gemisch aus Propanol und H₂O nicht mehr vom Gel zu lösen waren.

Durch Gelfiltrationen in denaturierendem Medium, zuerst über G-75 sf in Boratpuffer, 50 mM, pH 9,0, 1 % SDS, dann über S-200 sf in Boratpuffer, 50 mM, pH 9,0, 1 % SDS, 6 M Harnstoff, 1 % Mercaptoäthanol konnten diese Proteine ebenfalls nicht getrennt werden.

Da das "Fremdprotein" auf der SDS-PAGE das doppelte Molekulargewicht des PGAM-Monomers besaß und in der nativen Cellogel-Elektrophorese nach Coomassie-Anfärbung nur drei Banden zu sehen waren, die identisch waren mit drei durch Aktivitätsanfärbung sichtbaren Banden, wurde angenommen, daß es sich bei der "Fremdproteinbande" um dimere PGAM-A₂ handelte, die in der SDS-PAGE nicht dissoziierte. Diese Vermutung wurde nicht verifiziert, da die PGAM-A₂ Isolierungen aus der Mäuseleber nicht weitergeführt wurden.

Es wurde dafür mit der Isolierung der PGAM-A₂ aus der Niere begonnen. Mit einem Sechs-Schritt-Verfahren, bestehend aus Gewinnung des Rohextrakts, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephacel, Hydrophober Chromatographie auf Phenyl-Sephacel CL-4B, Gelfiltration auf G-75 sf, Gruppenspezifischer Affinitätschromatographie auf Blauer Sepharose und Hydroxylapatit-Chromatographie, konnte eine reine PGAM-A₂ gewonnen werden.

In letzter Zeit wurden PGAM-A₂ Isolierungen aus Schweineherz (Bartrons und Carreras, 1982), Schweineleber (Kulbe, Foellmer und Fuchs, 1982), Schweineniere

(Diederich et al., 1970) und Humangehirn (Omenn und Hermodson, 1975) veröffentlicht.

Schweineherz (Bartrons und Carreras, 1982). Die Isolierung durch BARTRONS und CARRERAS wurde bereits diskutiert. Die Autoren erzielten eine Ausbeute von 1 % bei einer spezifischen Aktivität von 309 U/mg Protein.

Schweineleber (Kulbe, Foellmer und Fuchs, 1982). Die von KULBE und Mitarbeitern beschriebene Methode, PGAM-A₂ aus Schweineleber zu isolieren, ist unserer Methode der Isolierung von PGAM-A₂ aus Mäusenieren deutlich überlegen. Die Autoren erzielten bei ihrem Fünf-Schritt-Verfahren, Gewinnung des Rohextraktes, Sephadex G-100 Gelfiltration, DEAE-Sephadex A-50 Ionenaustauschchromatographie und hydrophobe Chromatographie über C6-Sephadex, eine Ausbeute von 21 % bei einer spezifischen Aktivität von 308 U/mg Protein. Die von KULBE und Mitarbeitern eingeführten Präparationsschritte sind fast identisch mit den unseren, so daß die unterschiedlichen Ausbeuten vielleicht auf eine höhere Stabilität der Schweine-PGAM-A₂ zurückzuführen sind. Obwohl diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, erscheint uns wahrscheinlicher, daß unsere geringe Ausbeute auf die sehr viel niedrigeren Proteinkonzentrationen in unserer Präparation zurückzuführen sind (zum Vergleich: Von KULBE und Mitarbeitern wurden in den letzten Präparationsschritt 249 mg Protein eingesetzt, von uns nur 8 mg Protein; KULBE und Mitarbeiter begannen ihre Präparation mit 1 kg Leber von einem Tier, zur Isolierung von 30 g Mäusenieren wurden ca. 200 Mäuse getötet). Es ist bekannt, daß Enzyme bei niedrigen Proteinkonzentrationen schnell Aktivitätsverluste erleiden. RODWELL und Mitarbeiter (Rodwell, Towne und Grisolia, 1957) berichten von Hefe-PGAM einen Aktivitätsverlust von 80 % in 30 min bei einer Proteinkonzentration von 40 µg/ml.

Interessant erscheint uns, daß KULBE und Mitarbeiter ihre PGAM unter folgenden Bedingungen an die C6-Sephadex banden, K₃PO₄, 10 mM, EDTA, 1 mM, Mercaptoäthanol, 0,2 %, und durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten von 10-100 mM eluierten. Im allgemeinen werden Proteine bei hohen Salzkonzentrationen an ein hydrophobes Gel gebunden und durch sinkende Salzkonzentrationen (unter Umständen bei Zugabe von Seifen oder niederen Alkoholen, vergl. Pharmacia Produktinformation) eluiert.

Schweineniere (Diederich et al., 1970). DIEDERICH und Mitarbeiter isolierten PGAM-A₂ mit folgenden Präparationsschritten: Rohextrakt, Acetonfällung, Äthanolfällung, Hitzefällung, AS-Fällung, Sephadex G-100 und DEAE-Cellulose. Die Autoren erzielten eine Ausbeute von 9 %, bei einer spezifischen Aktivität von 1730 U/mg Protein.

Gehirn, human (Omenn und Hermodson, 1975). OMENN und HERMODSON isolierten PGAM-A₂ aus menschlichem Gehirn mit einer Ausbeute von 25-30 %. Die von ihnen verwendeten Präparationsschritte waren Hitzefällung mit 2,3BPG-Substratprotektion, DEAE-Sephadex A-50 und Sphadex G-200. Die Autoren geben an, eine PGAM isoliert zu haben, die in der SDS-PAGE keine Verunreinigungen mehr zeigte. Die spezifische Aktivität ihrer PGAM-A₂ geben die Autoren nicht an.

4.2 Physikalische und Chemische Eigenschaften

Die beschriebenen Molekulargewichte der PGAM aus Vertebraten bewegen sich zwischen 56.000 und 60.000 d (Tabelle 7).

Tabelle 7: Molekulargewichte von Phosphoglyceratmutasen

Autor	Spezies	Gewebe	Monomer in kd
Sheibley und Hass, 1976	Mensch	Erythrozyten	28,6
Hass et al., 1976	Mensch	Erythrozyten	28,0
Carne, McKay und Flynn, 1976	Huhn	Brustmuskel	31,5 $\pm$ 1,6
Bosch, Pons und Carreras, 1982	Huhn	Brustmuskel	29,0
Sasaki et al., 1976	Schwein	Erythrozyten	28,0 - 28,5
Bartrons und Carreras, 1982	Schwein	Herzmuskel	28,5 $\pm$ 1,0

Übereinstimmend damit ergaben unsere Molekulargewichtsbestimmungen auf SDS-PAGE:

Maus	Skelettmuskel	28,0
Maus	Leber	28,0
Kaninchen	Skelettmuskel	28,0
Alligator	Skelettmuskel	28,0
Bläshuhn	Brustmuskel	28,0

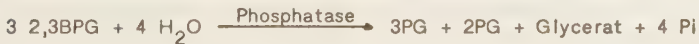
Dagegen sind die Molekulargewichte der PGAM eines Evertibraten und von Mikroorganismen deutlich unterschiedlich.

Schulmann und Valentino, 1982	Leberegel <i>Fasciola hepatica</i>	Gesamtextrakt	30,0 (Tetramer)
Singh und Setlow, 1979	<i>Bacillus megaterium</i>	Geamtextrakt	61,0 (Monomer)
Watabe und Freese, 1979	<i>Bacillus subtilis</i>	Gesamtextrakt	74,0 (Monomer)
Fothergill 1977	Hefe	Gesamtextrakt	28,5 (Tetramer)

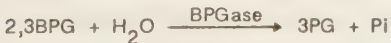
In der Entwicklungsreihe der Vertebraten bleiben die Molekulargewichte der PGAM im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant. Der Aufbau der Vertebraten-PGAM aus zwei Untereinheiten scheint für alle untersuchten Vertebraten erwiesen zu sein. Prokaryonten, Hefen und Trematoden scheinen PGAM mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Quartärstrukturen zu besitzen. Dadurch unterscheidet sich die PGAM deutlich von der PGK, die bei allen bisher untersuchten Organismen als Monomer mit Molekulargewichten von 47.000 auftritt (Kuntz und Krietsch, 1982a; Kuntz und Krietsch, 1982b).

Es liegen keine Ergebnisse über Molekulargewicht und Quartärstruktur der PGAM bei niederen Vertebraten, vor allem bei den Cyclostomata, bei niederen Chordaten und primitiven Deuterostomiern, vor.

Die Unterschiede der Aktivitätsoptima der PGAM-Isozyme in Abhängigkeit von Salzkonzentration, pH und Temperatur waren nicht signifikant. Es wurden dagegen deutliche Unterschiede in der Stabilität bei sauren pH-Werten beobachtet. Dabei fällt der unübliche Inaktivierungsverlauf der PGAM-B₂ auf, die nach 1 h Inkubation bei pH 1 noch Restaktivität zeigte. Es wurde zunächst angenommen, daß durch Umlagerung des Enzymmoleküls bei niederen pH-Werten eine unspezifische Phosphataseaktivität der PGAM induziert wurde.



Im Gegensatz zu dieser hypotetischen Phosphatase spaltet 2,3-Bisphosphoglycerat-phosphatase (E.C. 3,1,3,13) den Phosphatrest am C₂ ab.



Durch Modifikation des Standardtest konnte gezeigt werden, daß die "säureresistente" PGAM-B₂ 2,3BPG nicht am C₂ hydrolysieren kann. Die beobachtete Restaktivität war dementsprechend eine Mutaseaktivität. Die Restaktivität war 2,3BPG-abhängig und wurde durch Hg⁺⁺ inaktiviert, war also in diesen beiden Kriterien mit PGAM-B₂ identisch. Der Versuch wurde dreimal mit verschiedenen PGAM-B₂ Präparaten mit gleichen Ergebnissen durchgeführt. In bekannten Veröffentlichungen wurde die pH-Stabilität der PGAM, mit einer Ausnahme, nicht untersucht. JAMES und Mitarbeiter (James, Hurst und Flynn, 1971) bestimmten die Restaktivität von Schafmuskel-PGAM nur bis pH 3,8, so daß sie den beschriebenen Effekt nicht beobachten konnten. Es kann nur vermutet werden, daß PGAM-B₂ vom Schaf ebenfalls den beschriebenen Effekt zeigt.

Die höhere Stabilität der PGAM-B₂ bei Temperaturen über 50 °C im Vergleich zu PGAM-A₂ wurde von mehreren Autoren bereits beschrieben. Die Isozyme der

Maus unterscheiden sich in ihrer Thermolabilität nicht von den Isozymen des Menschen, des Rindes und des Schweins (Omenn und Hermodson, 1976; Kulbe, Fuchs und Foellmer, 1979; Mezquita et al., 1981; Bartrons und Carreras, 1982).

Inaktivierung von Muskel-PGAM-B₂ durch Hg⁺⁺, Ag⁺⁺ und Cu⁺⁺, nicht aber durch Ba⁺⁺ und Mg⁺⁺ wurde von COWGILL und PIZER (Cowgill und Pizer, 1956) beschrieben. Die unterschiedliche Hg⁺⁺-Sensibilität von PGAM aus verschiedenen Geweben wurde von DIEDERICH und Mitarbeitern (Diederich et al., 1970) beobachtet, der daraus auf die Existenz von PGAM-Isozymen bei Schwein, Rind und Mensch folgte. Außer bei Säugetieren, ist die unterschiedliche Hg⁺⁺-Sensibilität auch bei Reptilien, aber nicht bei Amphibien, Knochenfischen und Knorpelfischen beschrieben worden (Mezquita et al., 1982). Wie zu erwarten, verhielten sich die PGAM-Isozyme der Maus wie die der anderen Säuger.

MEZQUITA und Mitarbeiter (Mezquita et al., 1982) schlossen aus der Beobachtung, daß die Hg⁺⁺-Inaktivierung durch 2,3BPG verhindert wird, daß die empfindlichen Sulfhydrylgruppen an der Bindungsstelle für das Cosubstrat lokalisiert sind (Hartmann und Norton, 1976).

4.3 Katalytische und Kinetische Eigenschaften

Die PGAM aller bisher untersuchten Vertebraten benötigen 2,3BPG für die optimale Aktivität (Carreras et al., 1982). Dabei wurde bei manchen Vertebraten-PGAM eine absolute 2,3BPG-Abhängigkeit festgestellt, während die PGAM anderer Vertebraten eine geringe 2,3BPG-unabhängige Mutasewirkung zeigten. Nach Angaben von CARRERAS und Mitarbeitern bewegte sich die 2,3BPG-unabhängige Aktivität zwischen 5 % (*Tropidonotus natrix*) und 0,5 % (*Rana ridibunda*). Die von uns gemessene 2,3BPG-unabhängige Mutaseaktivität der PGAM-A₂ und PGAM-B₂ der Maus war mit 2 % identisch mit der der von CARRERAS und Mitarbeitern untersuchten PGAM aus der Ratte (*Rattus norvegicus*).

Aus ihren Untersuchungen der Mutaseaktivität der Humanerythrozyten-PGAM bei Zugabe von nachgereinigtem 3PG als Substrat, leiteten HASS und MILLER die Schlußfolgerung ab, daß 2,3BPG nicht als Cosubstrat in die Mutasereaktion eingreift, sondern als Aktivator (Hass und Miller, 1980). Die Autoren nahmen an, daß ein im kommerziell erhältlichen 3PG vorhandener, nicht identifizierter Inhibitor die PGAM hemmt, und 2,3BPG diese Hemmung aufhebt. Die Schlußfolgerung von HASS und MILLER widersprechen den Ergebnissen von BLÄTTLER und KNOWLES (Blättler und Knowles, 1980), die, von einer Untersuchung der Phosphatgruppenübertragung von 2PG ausgehend, eine 2,3BPG-

Abhängigkeit der PGAM aus Kaninchenmuskel und Hefe feststellten. Obwohl unsere Untersuchungen diesen Aspekt nicht direkt berührten, konnte gezeigt werden, daß im Rücktest (2PG 3PG) 2,3PG benötigt wird. Danach müßte der von HASS und MILLER postulierte Inhibitor auch im kommerziell erhältlichen 2PG vorhanden sein. Erstaunlicherweise wurden die 2,3BPG-unabhängigen PGAM der Pflanzen und mancher niederer Tiere durch den von HASS und MILLER postulierten Inhibitor nicht gehemmt (Ito und Grisolia, 1959; Fernandez und Grisolia, 1960; Carreras et al., 1982).

Eine Bisphosphataseaktivität der PGAM wurde u.a. von HARKNESS und Mitarbeitern (Harkness et al., 1970) ROSA und Mitarbeitern (Rosa, Audit und Rosa, 1975), ROSE und DUBE (Rose und Dube, 1978), IKURA und Mitarbeitern (Ikura et al., 1978) und BOSCH und Mitarbeitern (Bosch, Pons und Carreras, 1982) beschrieben. Die Phosphatase-Aktivität der PGAM kann durch Hg^{++} , hohe Salzkonzentrationen, Pyrophosphat und 2-Phosphoglycolat induziert werden (vergleiche 2,3BPG-Bestimmung, 3.6.3), die nicht induzierte Phosphataseaktivität der PGAM beträgt nach IKURA und Mitarbeitern 0,3 ‰ (Humanerythrozyten), noch BOSCH und Mitarbeitern 0,4 ‰ (Hühnermuskel) der Mutaseaktivität. ROSE und DUBE konnten dagegen keine Phosphataseaktivität ohne Induktion durch 2-Phosphoglycolat feststellen. Es ist anzunehmen, daß die Phosphataseaktivität der PGAM zu gering war, um durch unseren Test entdeckt zu werden. Durch Induktion mit Phosphoglycolat und K_2HPO_4 konnte die Bisphosphataseaktivität beider PGAM induziert werden. Das Maß der Induktion auf 22 ‰ der Mutaseaktivität bei PGAM-A₂ stimmt in der Größenordnung mit veröffentlichten Angaben überein (Ikura et al., 1978).

In den oben aufgeführten Arbeiten wurde neben der Bisphosphoglycerat-Phosphatase eine zusätzliche Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität beschrieben, die bei PGAM-A₂ und -B₂ nicht gefunden wurde. Nachdem Phosphatase und Bisphosphoglyceratmutase-Aktivität bisher von anderen Rodentien nicht beschrieben wurden, besteht die Möglichkeit, daß diese Nebenaktivitäten bei Nagetieren sehr gering oder nicht vorhanden sind.

Wie die PGAM anderer Säuger (Cowgill und Pizer, 1956) benötigten die PGAM der Maus keine zweiwertigen Metallionen als Cofaktor. Die Säuger- (und Hefe-)PGAM unterscheiden sich darin von den PGAM mancher Mikroorganismen (Oh und Freese, 1976; Singh und Setlow, 1979).

Die PGAM der Maus wurden durch eine Anzahl von substratähnlichen Verbindungen inhibiert. COWGILL und PIZER erzielten bei der Kaninchen-muskel-PGAM eine maximale Inhibition von 65 % mit C_2 -phosphorylierter Milchsäure. Beim Vergleich hemmender und nichthemmender Verbindungen wird offensichtlich, daß den Inhibitoren eine terminale Carboxylgruppe und eine freie oder phosphorylierte Hydroxylgruppe am C_2 -Atom gemeinsam ist.

Aus der Tatsache, daß PGAM- B_2 der Maus durch PEP stärker gehemmt wurde, könnte gefolgert werden, daß PGAM- A_2 eine höhere Substratspezifität als PGAM- B_2 besitzt. Da sowohl PGAM- A_2 wie PGAM- B_2 hohe Inhibitorkonstanten für PEP (3.7.1) aufwiesen, kann eine physiologische Bedeutung daraus nicht abgeleitet werden. Die physiologischen Konzentrationen von PEP in der Leber und im Muskel der Ratte sind $73 + 15$ nMol/g Leber frisch (Müllhofer, persönliche Mitteilung) und ca. 100 nMol/g Muskel frisch (Hohorst, Reim und Bartels, 1962). Vergleichbare Untersuchungen an PGAM anderer Organismen sind (mit Ausnahme der zitierten Arbeit) nicht bekannt, die beobachteten Unterschiede in der Substratspezifität der Isozyme der Maus könnten dementsprechend spezifisch für diese Art oder nahe Verwandte sein.

Um die Diskussion der Substrataffinitäten (K_m -Werte) zu erleichtern, wurden die in der Literatur veröffentlichten Daten in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Veröffentlichte Km von Phosphoglyceratmutasen

Autor	Spezies	Gewebe	3PG mM	Km	
				2PG mM	2,3BPG µM
Rodwell, Towne und Grisolia, 1957	Kaninchen	Muskel	---	0,01	130
Harkness und Ponce, 1969	Ziege	Erythro- zyten	0,60	---	5
James, Hurst und Flynn, 1971	Schaf	Muskel	9,00	---	3
Omenn und Hermodson, 1975	Mensch	Gehirn	1,67	---	---
Sheibley und Hass, 1976	Mensch	Erythro- zyten	---	---	86
Rose und Dube, 1978	Huhn	Brust- muskel	0,17	0,014	0,07
Ikura et al., 1978	Mensch	Erythro- zyten	0,22	---	0,12
Bartrons und Carreras, 1982	Schwein	Herz- muskel	A ₂ 0,1 AB 0,1 B ₂ 0,2	--- --- ---	0,4 0,4 0,5
Hill und Attwood 1976	Hyphomicrobium X		6	0,69	8
Hill und Attwood, 1976	Pseudomonas Aml		3,4	0,37	10
Willets, 1979	Flavobacterium sp.		3,5	0,52	76
Singh und Setlow, 1979	Bacillus megaterium		0,5	---	---
Watabe und Freese, 1979	Bacillus subtilis		1,1	1,47	---
Schulman und Valentino, 1982	Fasciola hepatica		2,1	---	47

Da die Bestimmung der Michaelis-Konstanten für ein Substrat von verschiedenen Parametern wie pH, Temperatur, Salzkonzentration, Konzentration der anderen Substrate abhängig ist, können K_m -Werte aus verschiedenen Labors nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden.

Die K_m -Werte für 3PG bewegen sich bei den Vertebraten zwischen 0,1 mM und 9,0 mM, für 2PG zwischen 10 μ M und 14 μ M, für 2,3BPG zwischen 0,07 μ M und 86 μ M. NIEBAUER (Niebauer, 1975) fand für Humanerythrozyten-PGAM Werte von 0,53 mM (3PG), 0,11 mM (2PG) und 82 μ M (2,3BPG). Die von uns bestimmten Werte liegen nicht außerhalb des Bereichs der anderen Autoren. Die Unterschiede zwischen den K_m -Werten der PGAM-Isozyme der Maus für 2PG und 3PG sind unbedeutend, dagegen weichen die K_m -Werte für 2,3BPG deutlich voneinander ab. Da PGAM-A₂ das in den Erythrozyten der Maus auftretende Isozym ist, könnte der höhere K_m -Wert eine Adaptation an die hohen 2,3BPG-Werte in den Erythrozyten der Säuger sein.

Die beschriebenen spezifischen Aktivitäten von gereinigten PGAM aus Säugern und Vögeln sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Spezifische Aktivitäten von Phosphoglyceratmutasen

Autor	Spezies	Gewebe/Isozym	U/mg Protein
Diederich et al., 1970	Schwein	Niere A ₂	1730
Bartrons und Carreras, 1982	Schwein	Herzmuskel A ₂	309
		AB	352
		B ₂	392
Kulbe, Foellmer und Fuchs, 1982	Schwein	Leber A ₂	308
		Muskel B ₂	340
James, Hurst und Flynn, 1971	Schaf	Muskel B ₂	828
Sheibley und Hass, 1976	Mensch	Erythrozyten A ₂	525
Kulbe, Fuchs und Foellmer, 1979	Rind	Muskel B ₂	336
		Leber A ₂	276
Narita et al., 1979	Kaninchen	Erythrozyten A ₂	1200
Scopes und Stoter, 1982	Kaninchen	Skelettmuskel B ₂	1000
Bosch, Pons und Carreras, 1981	Huhn	Brustmuskel	1559
Petell et al., 1982	Huhn	Brustmuskel	295

Die spezifischen Aktivitäten der PGAM sind beim Vergleich verschiedener Spezies deutlich unterschiedlich, auch wenn unterschiedliche Testbedingungen berücksichtigt werden. Dagegen sind die spezifischen Aktivitäten der PGAM-Isozyme

einer Art annähernd gleich groß, wobei PGAM-B₂ eine etwas höhere spezifische Aktivität als PGAM-A₂ besitzt (Kulbe, Fuchs und Foellmer und Fuchs, 1979; Bartrons und Carreras, 1982; Kulbe, Foellmer, 1982). Die deutlichen Unterschiede in der spezifischen Aktivität der PGAM-Isozyme der Maus (515 U/mg Protein für B₂, 200 U/mg Protein für A₂), sind mit größter Wahrscheinlichkeit auf Inaktivierung der PGAM-A₂ beim letzten Präparationsschritt (Hydroxylapatit-Chromatographie) zurückzuführen.

Einer der wichtigsten Gründe, die Isolierung der PGAM-Isozyme der Maus durchzuführen, war die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten. Bei der Kartierung von Pgam-1 auf Chromosom 19 durch Gen-Dosis-Effekt-Bestimmungen an foetalen Geweben von Ts 19 Tieren konnte eine PGAM-A₂ Aktivitätserhöhung in Leber, Erythrozyten und Gehirn trisomer Tiere im Vergleich zu normalen Kontrollen beobachtet werden. Da in Geweben mit aneuploidem Chromosomensatz unspezifische, nicht Gen-Dosis-bedingte Aktivitätserhöhungen auftreten können (Ferguson-Smith und Aitken, 1982), wurden die Verschiebungen des Isozymmusters im Herzmuskel von Trisomien, die rechnerisch auf eine Triploidie von Pgam-1 zurückgeführt werden konnten, als weiterer Hinweis für die Lokalisierung von Pgam-1 auf Chromosom 19 gewertet (vergl. Abb. 49). Dabei wurde davon ausgegangen, daß die spezifischen Aktivitäten der PGAM-Isozyme ungefähr gleich sind. Diese Annahme konnte durch die Isolierung der PGAM-Isozyme nicht bestätigt werden. Die inzwischen als gesichert zu betrachtende Kartierung von Pgam-1 auf Chromosom 19 der Maus durch den Nachweis der konservativen Kopplungsgruppe Pgam-1 -- Got-1 (Junien et al., 1982) ermöglicht durch die quantitative Auswertung von PGAM-Elektrophoresen trisomer und euploider Herzen die Schlußfolgerung, daß die in vivo Aktivitäten der PGAM-Isozyme der Maus annähernd gleich sind.

4.4 Phylogenie der PGAM

Die Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen bestätigen im wesentlichen die Resultate von OMENN und HERMODSON (Omenn und Hermodson, 1975) und MEZQUITA und CARRERAS (Mezquita und Carreras, 1981). OMENN und HERMODSON hatten Gewebeextrakte von vier Säugern (Affe, Ratte, Maus und Meerschweinchen) und vom Huhn untersucht und bei Säugern im Gegensatz zum Huhn, Isoenzyme festgestellt. In einer umfangreicheren Arbeit untersuchten MEZQUITA und CARRERAS alle Klassen der Vertebraten mit Ausnahme der Cyclostomata. Beim Vergleich der Resultate wird vorausgesetzt, daß die für Mensch (Junien et al., 1982) und Maus (Fundele et al., 1981) nachgewiesenen

Pgam-Gene wie auch die PGAM-Isozyme der Säugetiere (Omenn und Cheung, 1974; Omenn u. Hermodson, 1975; Fundele, 1979; Mezquita und Carreras, 1981) homolog mit den Pgam-Genen und den PGAM-Isozymen der anderen Vertebraten sind.

Cyclostomata

Das Auftreten eines einzigen Isozyms bei den Cyclostomata, Ordnung Petromyzonta, legt die Vermutung nahe, daß bei den Neunaugen nur ein Pgam-Gen existiert, und daß eine Duplikation des Pgam-Genortes während der Evolution zu den Gnathostomata erfolgte. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Vorfahren der rezenten Neunaugen zwei Pgam-Gene besaßen, von denen eines während der Evolution verloren ging oder in den rezenten Neunaugen nicht mehr exprimiert wird. Leider konnten nur das Flußneunauge und das davon abgeleitete Bachneunauge (Hubbs und Potter, 1971; Hardisty und Potter, 1971) untersucht werden, da Vertreter der zweiten Ordnung der Cyclostomata (Myxinoidea, Schleimfische oder Inger) nicht erhältlich waren. WHITT und Mitarbeiter (Whitt, Shaklee und Markert, 1975) zeigten, daß bei Petromyzonta nur ein Ldh-Genort existiert, bei Myxinoidea dagegen zwei.

Genduplikationen während der Evolution von den Agnatha zu den Gnathostomata im Zusammenhang mit einer Polyploidisierung des Genoms (Ohno, 1970) sind z.B. von den Ldh- (Whitt, Shaklee und Markert, 1975) und den Hämoglobin- (Goodman und Moore, 1973) Genen bekannt. Aus immunologischen Untersuchungen wurde nicht ersichtlich, welches Isozym (PGAM-A₂ oder PGAM-B₂) in den Geweben der Neunaugen auftritt, da Anti-PGAM-B₂ gegen Maus bzw. Alligator nicht mit Lampetra-PGAM reagierten.

Chondrichthyes

Beim Katzenhai (*Scyliorhinus caniculus*, Fam. Scyliorhinidae) traten drei Isozyme auf, deren Verteilung der bei den anderen Vertebratenklassen (Osteichthyes, Amphibia, Reptilia, Mammalia) nicht entspricht. Diese Isozymverteilung wurde auch von MEZQUITA und CARRERAS beobachtet. Da sich die Chondrichthyes unabhängig von den zur Tetrapodenreihe führenden Osteichthyes entwickelt haben (siehe Abb. 44) sind folgende Schlußfolgerungen möglich:

1. Die Pgam-Genduplikation erfolgte in der Vertebratenevolution vor der divergenten Evolution von Chondrichthyes und Osteichthyes.

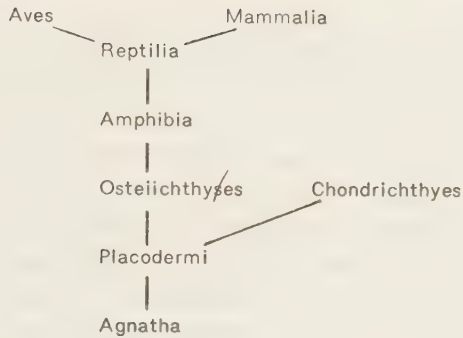


Abb. 44: Schematischer Stammbaum der Vertebraten nach Romer, 1971

2. Die Pgam-Genduplikation erfolgte kurz vor der Divergenz von Chondrichthyes und Osteichthyes, so daß sich in den beiden Evolutionsreihen unterschiedliche Gewebespezifitäten entwickelten.

Es wird dabei davon ausgegangen, daß die drei z.B. in der Milz der Haie beobachteten Isozyme homolog mit den PGAM-A₂, PGAM-AB und PGAM-B₂ Isozymen der anderen Vertebraten sind. Ausschließlich im Gehirn der untersuchten Haie wurde eine vierte, am schnellsten zur Anode wandernde Isozymbande beobachtet (PGAM-C₂). Nachdem keine Hybrid-Isozyme durch Dimerisierung von PGAM-C und PGAM-A oder PGAM-B Untereinheiten beobachtet wurden, ist anzunehmen, daß nur der für PGAM-C codierende Genort in manchen Gehirnzelltypen exprimiert wird, während in anderen Zelltypen Pgam-1 (PGAM-A-Untereinheit) und Pgam-2 (PGAM-B-Monomere) exprimiert werden (vergl. z.B. die Neuronenspezifische Enolase), so daß in Gesamtgehirnextrakten die Isozyme PGAM-A₂, PGAM-AB, PGAM-B₂ und PGAM-C₂ auftreten. Es wird angenommen, daß sich der für PGAM-C codierende Genort durch Duplikation von Pgam-1 oder Pgam-2 entwickelt hat und sekundär die Expression des Pgam-3 Gens auf Gehirnzellen eingeschränkt wurde (vergl. z.B. die Entwicklung der LDH-Isozyme (Whitt, Shaklee und Markert, 1975), der CPK-Isozyme (Fisher und Whitt, 1978) bei den Osteichthyes oder die Entwicklung des Pkg-2-Genes bei Marsupialia und Placentalia (VandeBerg, Cooper und Close, 1973). Diese Theorie impliziert, daß das PGAM-C₂-Isozym auch bei anderen Haifamilien und bei den von den Haien abgeleiteten Rochen (Überfam. Batoidea) auftritt. PGAM-C₂ wurde von MEZQUITA und CARRERAS nicht beobachtet. Es kann aber, nach den von den Autoren beschriebenen Elektrophoresebedingungen und

der Photographie des Gels davon ausgegangen werden, daß das PGAM-C₂-Isozym über das Gel hinaus in den Anodenpuffer gelaufen ist.

Osteichthyes

MEZQUITA und CARRERAS beschreiben für die von ihnen untersuchte Goldstrieme (Boops boops, Fam. Sparidae, Ordn. Percomorpha) eine dem Katzenhai ähnliche Gewebeverteilung der PGAM-Isozyme. Dagegen ist das Isozymmuster des Aals "konservativ". Diese Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, daß diese Fische zu verschiedenen Ordnungen gehören, bei dem ebenfalls zu den Percomorpha gehörenden *Hemichromis bimaculatus* wurde allerdings ein "konservatives" Isozymmuster gefunden. Die abweichenden Isozymmuster von Brachse und Forelle sind auf Diploidisierungen in der Evolution mancher Cypriniformes und Clupeiformes zurückzuführen (Ohno, Wolf und Atkin, 1968; Hinegardner und Rosen, 1972). Bei beiden untersuchten Fischen führte die Duplikation des Pgam-1 Genes zu elektrophoretisch nachweisbaren Isozymen (vergleiche z.B.: Klose et al, 1969; Schmidtke und Engel, 1972; Engel, Schmidtke und Wolf, 1975), die in den verschiedenen Organen unterschiedlich stark auftreten. Diese Beobachtung spricht für präferentielle Expression der Pgam-1 oder Pgam-1' Genorte in den verschiedenen Organen und damit vielleicht für eine physiologische Adaption der PGAM-AA, PGAM-AA' und PGAM-A'A' Isozyme an metabolische Bedürfnisse einzelner Organe (Bailey und Thye, 1975). Eine der zwei untersuchten Regenbogenforellen zeigte ein deutlich komplexeres Muster im schnellen Isozym "cluster". Dieses Isozymmuster kann durch die Annahme erklärt werden, daß dieses Tier heterozygot an einem Genort (Pgam-1 oder Pgam-1') war.

Im Muskel der Brachse wurde nur ein langsames Isozym, im Herzmuskel dagegen wurden drei "langsame" Isozyme beobachtet. Wie bei den "schnellen" Isozymen der Brachse mit unterschiedlicher Organspezifität, kann auch bei den "langsamen" Isozymen eine Adaptation an unterschiedliche Bedingungen in Skelettmuskel und Herzmuskel diskutiert werden.

Bei den Regenbogenforellen wurde im Herzmuskel und Skelettmuskel nur ein langsames Isozym beobachtet. Es wäre denkbar, daß entweder die duplizierten Pgam-2 Gene (n=4) weiterhin existieren, aber die resultierenden Proteine durch elektrophoretische Methoden nicht aufgetrennt werden können (Bailey et al., 1970), oder daß eines der duplizierten Gene in der Regenbogenforelle nicht exprimiert wird oder eines der duplizierten Gene in der Evolution verloren gegangen ist. Interessant ist, daß auch bei gleichzeitiger Expression von Genen, die für die "langsamen" und die "schnellen" Isozyme codieren (Abb. 38), keine Hererodimeren gefunden wurden.

Amphibia

Von den Amphibien zeigten Molch und Krallenfrosch ein "konservatives" Isozymmuster, Ausnahmen davon zeigten Aga und Wasserfrosch (*Rana esculentea*), die im Herzen nur das PGAM-A₂ Isozym hatten. Abweichend davon beschreiben MEZQUITA und CARRERAS für den Seefrosch (*Rana ridibunda*) und die Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) drei Isozyme im Herzen. Aga und Wasserfrosch waren mit Sicherheit adulte Tiere, das ausschließliche Auftreten von PGAM-A₂ ist somit nicht auf eine juvenile Expression von Pgam-Genen zurückzuführen. Die Unterschiede in der Expression der PGAM-Isozyme im Herzmuskel der Frösche sind bemerkenswert, weil *Rana esculentea* als Hybridform zwischen *Rana ridibunda* und *Rana lessonae* betrachtet wird (Kremer, 1983).

Reptilia

Alle untersuchten Reptilien (Mezquita und Carreras: *Psamodromus algirus*, *Tropidonotus natrix*, Ordn. Squamata; *Chlemis caspica*, Ordn. Chelonida) zeigen ein Isozymmuster, das dem der Säuger entspricht. Die intensive PGAM-B₂ Isozymbande bei *Chinemys reevesii* wird durch den Aufbau der Schildkrötenlunge mit eigenen Muskeln erklärt (Wood und Lenfant, 1976).

Aves

Neben den primitiven Neunaugen besitzen die Vögel, allerdings sekundär keine PGAM-Isozyme. Daraus kann zunächst argumentiert werden, daß einer der beiden Pgam-Loci während der Evolution von den Reptilien zu den Vögeln verloren gegangen ist, oder daß beide Pgam-Loci in den rezenten Vögeln vorhanden sind, aber nur einer in allen Geweben exprimiert wird.

Da sich die Vögel aus Archosauria entwickelt haben (Romer, 1966; de Beer 1975; Ostrom, 1974) wurde als rezenter Vertreter dieser Unterklasse ein Alligator (Ordn. Crocodilia) untersucht. Der Alligator besaß ein "konservatives" PGAM-Isozymmuster, es kann also angenommen werden, daß die Reduktion der PGAM-Isozyme in der Evolutionsreihe erfolgte, die direkt zu den Vögeln führt.

Die elektrophoretischen Auftrennungen von Bläßhuhngewebe ergaben, daß in Milz und Erythrozyten zusätzliche Isozyme vorhanden sind, die jedoch nur einen geringen Teil der PGAM-Geamtaktivität in diesen Organen ausmachten.

Heterozygotismus kann durch das Fehlen der zusätzlichen Isozyme in allen anderen Geweben ausgeschlossen werden. Dagegen ist es durchaus möglich, daß es sich bei den schwachen Isozymbanden um posttranslationale Isozyme handelt,

die *in vivo* entweder durch epigenetische Modifikation oder durch aufeinanderfolgendes Einfrieren und Auftauen *in vitro* gebildet wurden (das Bläßhuhn war bis zur ersten elektrophoretischen Untersuchung eine Nacht eingefroren). Gegen die erste Annahme spricht die Beobachtung, daß sekundäre Isozyme in frischen Gewebeextrakten mit dem verwendeten Elektrophorese-System nie beobachtet wurden. Da sich das Isozymmuster in Gewebeextrakten aus Milz und Erythrozyten auch nach längerer Zeit nicht veränderte, erscheint auch die zweite Annahme nicht schlüssig, daneben ist es nicht wahrscheinlich, daß *in vitro* Modifikationen in den anderen Geweben nicht auftreten. Ausgehend von der vermuteten Existenz genetisch codierter Isozyme beim Bläßhuhn und einer gesicherten monophyletischen Deszendenz der rezenten Vogelordnungen (de Beer, 1975), kann die Hypothese aufgestellt werden, daß die zwei bei den Säugetieren nachgewiesenen Pgam-Gene auch bei den Vögeln vorhanden sind, daß aber in den Geweben fast aller untersuchter Vögel nur ein Gen exprimiert wird. Hierbei wird die Möglichkeit außer Acht gelassen, daß die entsprechenden Gene durch Duplikation des persistierenden Pgam-Gens in der Evolution der Gruiformes oder der Rallidae sekundär entstanden sind.

MEZQUITA und CARRERAS (Mezquita und Carreras, 1981) zeigten, daß auch in den Geweben embryonaler Hühner nur ein PGAM-Isozym auftritt. Dagegen wurden Untersuchungen an neoplastischen Geweben von Vögeln nicht durchgeführt: OMENN und CHEUNG (Omenn und Cheung, 1974) zeigten, daß in neoplastischen Zellen des Menschen PGAM-Isozyme auftreten, die in diesem Zelltypen sonst nicht beobachtet wurden (z.B. PGAM-B₂ in malignen Gehirntumoren). Die Frage nach der Homologie der PGAM-Isozyme der Vögel wurde mit immunologischen Methoden untersucht. Da in den Organen des Bläßhuhns vorwiegend ein langsames Isozym auftrat, bestand die Möglichkeit, daß bei allen Vögeln Pgam-B₂ exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde PGAM-B₂ aus dem Muskel eines Krokodils isoliert, das als rezenter Archosaurier der nächste Verwandte der Vögel ist, und Antikörper dagegen gewonnen. Die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony von Anti-Alligator-PGAM-B₂-Antikörpern gegen Gewebeextrakte von Huhn, Bläßhuhn und Sperling war uninformativ, weil in keinem Fall eine Präzipitation beobachtet wurde. Die fehlende Reaktivität der gewonnenen Anti-PGAM-Antikörper gegen PGAM anderer Spezies, außer sehr nahe Verwandter wie z.B. Ratte und Maus (beide Unterfamilie Murinae), läßt den Aufwand weiterer immunologischer Ansätze zur Lösung dieses Problems als nutzlos erscheinen. Das gleiche Problem versuchten MEZQUITA und Mitarbeiter (Mezquita et al., 1981) mit Untersuchungen der Hitze- und Quecksilberlabilität der PGAM von Huhn und Taube zu lösen, erhielten jedoch kein eindeutiges

Ergebnis. Während die PGAM von Taube und Huhn beide durch einstündige Inkubation bei 60 °C inaktiviert werden (vergl. PGAM-A₂ der Maus) ist das Verhalten gegenüber den verwendeten Sulfhydrylgruppen-Reagentien (Hg⁺⁺ und Tetrathionat) unterschiedlich.

Mammalia

Alle untersuchten Säuger zeigen mit geringfügigen Modifikationen ein konservatives PGAM-Isozymmuster.

Die phylogenetischen Untersuchungen lassen folgende Interpretationen zu:

1. Die Petromyzonta besitzen in allen Geweben nur ein Isoenzym, was wahrscheinlich auf die Existenz eines einzigen Gens zurückzuführen ist.
2. Eine Duplikation des PGAM-Genes in der Evolution der Gnathostomata und nachfolgende unterschiedliche Mutationen der Gene führte zur Bildung von Isozymen, deren Gewebespezifität in der zu den Tetrapoda führenden Evolutionsreihe konstant bleibt, während die Haie eine andere Gewebespezifität der PGAM-Isozyme entwickelten.
3. In der phylogenetischen Entwicklung der Haie erfolgte eine weitere Genduplikation, die zur Evolution eines gehirnspezifischen Isozyms führte.
4. Als einzige Tetrapodenklasse besitzen die Vögel nur ein Isozym. Es ist nicht geklärt, ob diese Reduktion durch den Verlust eines Gens in der Evolution oder durch dauernde Reprimierung eines Gens verursacht wurde.

4.5 Gewebespezifität und Ontogenie der PGAM-Isozyme

Die Existenz gewebespezifischer Isozyme bei Säugern wurde für foetalen und adulten Skelettmuskel, foetalen und adulten Herzmuskel, Gehirn (Gehirntumore), Leber (Lebertumore), Niere, Erythrozyten, Leukozyten und Teratokarzinomen beschrieben (Omenn und Cheung, 1974; Chen et al., 1974; Rosa, Audit und Rosa, 1975; Adamson, 1976; Fundele, 1979; Bücher et al., 1980; Fundele et al., 1981; Mezquita und Carreras, 1981). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe weiterer Organe der Maus untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf die männlichen Gonaden und die männlichen Keimzellen gelegt wurde, weil die Existenz testis- oder spermienspezifischer Isozyme wie bei LDH (Goldberg, 1963; Blanco und Zinkham 1963) und PGK (VandeBerg, Cooper und Close, 1976) untersucht werden sollte.

Es zeigte sich, daß testisspezifische Isozyme der PGAM bei der Maus wie beim Menschen (eigene Ergebnisse) nicht existieren. Überraschend ist, daß

in Testis, Epididymis und angereicherten Spermien eine intensive PGAM-B₂ Isozymbande vorhanden war. Da die relative Aktivität der PGAM-B₂ zu PGAM-A₂ mit der Anreicherung der Spermien von Testis zu Epididymis und Spermienpräparation zunahm, kann gefolgert werden, daß die PGAM-B₂ in Epididymis und Testis in Spermien, bzw. Spermatogonien lokalisiert ist. Diese Ergebnisse wurden inzwischen durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Kozak, L.P., persönliche Mitteilung).

Die physiologische Bedeutung der ansonsten auf Skelettmuskel und Herzmuskel beschränkten Expression des Pgam-2 Genortes in Spermien ist nicht klar. Bei allen anderen Organen der Maus ist PGAM-A₂ das vorherrschende oder ausschließlich auftretende Isozym. Das Fehlen von PGAM-B₂ in Blase, Dünndarm und Uterus impliziert, daß Pgam-2 im glatten Muskel nicht exprimiert wird.

WOLF und ENGEL (Wolf und Engel, 1972) teilten verschiedene Enzyme nach ihrem Aktivitätsprofil während der Präimplantationsperiode in drei Klassen ein.

1. Enzyme mit konstanter, verhältnismäßig hoher Aktivität in der Zygote mit später abnehmender Aktivität

Zu dieser Gruppe gehören die Glykolyseenzyme PFK (Brinster, 1971a), TPI (Kozak und Quinn, 1975), PGK (Kozak und Quinn, 1975; Krietsch et al., 1982) und LDH (Brinster, 1965; Epstein, Wegienka und Smith, 1969; Wolf und Engel, 1972; Spielmann, Erickson und Epstein, 1974; Brinster, 1979).

2. Enzyme mit einem stetigen, leichten Aktivitätsanstieg

Zu dieser Gruppe gehören die Enzyme ALD (Epstein, Wegienka und Smith, 1969) und MDH (Brinster, 1966)

3. Enzyme mit einem starken Aktivitätsanstieg

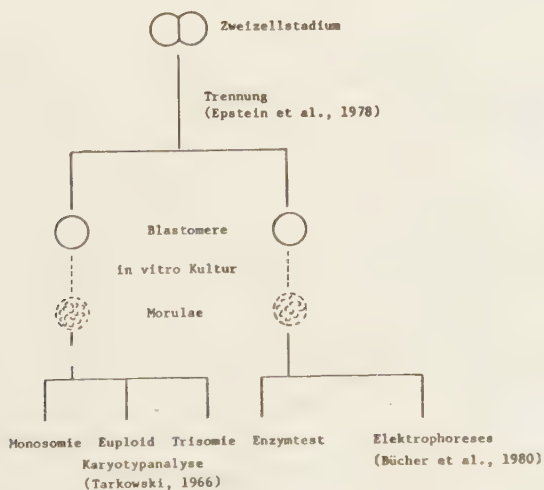
Ein starker Aktivitätsanstieg im Präimplantationsstadium wurde bei 6PGDH (Brinster, 1971b), β -Glucuronidase (Wudl und Chapman, 1976) und α -Galactosidase (Adler, West und Chapman, 1977) festgestellt.

Das Aktivitätsprofil der PGAM in Präimplantationsstadien gleicht dem der Enzyme der ersten Gruppe. Es kann davon ausgegangen werden, daß die in den ersten zwei Tagen der Embryonalentwicklung gemessene PGAM in der Oocyte synthetisiert wurde. Da am dritten Tag der Embryonalentwicklung die PGAM-Aktivität wieder anstieg, werden im Morulastadium wahrscheinlich beide, bzw. einer der beiden Pgam-1 Genorte erstmals exprimiert. Von der Morula (Tag 3) bis zum sechs Tage alten Eizylinder steigt die Aktivität um einen Faktor von 200. Die Aktivitätsprofile der PGAM und der PGK (Krietsch et al., 1982) sind äußerst ähnlich.

Genetische Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, das Pgam-2 Gen der Maus zu kartieren. Elektrophoretische oder Aktivitätsvarianten der PGAM-B₂ wurden nicht beobachtet, eine klassische Kopplungs-Analyse war nicht möglich. Es ist bekannt, daß Glykolyseenzyme beim Menschen wie bei der Maus eine geringe Variation aufweisen (Cohen et al., 1973; Bulfield, Moore und Kacser, 1978). In einem an unserem Institut durchgeführten screening, bei dem Glykolyseenzym-aktivitäten in Erythrozyten gemessen wurden, wurde bei ca. 4000 untersuchten Personen (Krietsch, persönliche Mitteilung) keine PGAM-Aktivitätsvariante gefunden, während CHEN und Mitarbeiter (Chen et al., 1974) über das Auftreten von zwei elektrophoretischen Varianten bei 1035 Personen berichteten. Vor kurzem wurde über einen Patienten mit einer metabolischen Myopathie berichtet, die auf eine fehlende PGAM-B₂ Aktivität im Muskel dieses Patienten zurückzuführen sein soll (Di Mauro et al., 1981; Di Mauro et al., 1982).

Durch Untersuchung aller induzierbaren Trisomien bzw. Monosomien der Maus (Gropp, Giers und, Kolbus, 1974; Gropp, Kolbus und Giers, 1975) sollte mit einer Kombination aus verschiedenen Techniken das Pgam-2 Gen kartiert werden (siehe folgendes Flußdiagramm).



Dieser Ansatz wurde durch die fehlende Expression von Pgam-2 in Präimplantationsstadien der Maus unmöglich gemacht, die Zahl der zur Verfügung stehenden Trisomien auf solche reduziert, die das Embryonalstadium (Tag 12) erreichen, in dem PGAM-B₂ oder PGAM-AB (im Herzmuskel) nachgewiesen werden können (Abb. 43).

Von den Trisomien der Maus, die für diese Untersuchung zur Verfügung stehen, Ts1, Ts6, Ts10, Ts12, Ts13, Ts14, Ts16, Ts18 und Ts19, wurden die Trisomien Ts12, Ts14, Ts16, Ts18 und Ts 19 untersucht. Beim Vergleich der PGAM-Muster der trisomen Foeten mit denen von euploiden Geschwistern ("litter-mates") wurden keine Unterschiede gefunden. Pgam-2 liegt dementsprechend nicht auf den Chromosomen 12, 14, 18 und 19 der Maus. .

Pgam-2 wird in Fibroblasten der Maus nicht exprimiert (3.10.1), deshalb ist eine Kartierung des Pgam-2 Gens durch somatic cell genetics nur in Verbindung mit neueren Techniken möglich (Deisseroth et al., 1977).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die PGAM-Homodimere der Maus wurden erstmals isoliert und vergleichend charakterisiert.
2. Von beiden Enzymen wurden die wichtigsten physikalisch-chemischen und katalytischen Eigenschaften bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.
3. Die beiden Isozyme zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrem katalytischen Verhalten und ihren Temperatur-, pH- und Salzkonzentrationsoptima. Die Molekulargewichte der Enzyme sind identisch.
4. Die Isozyme sind deutlich unterschiedlich in ihrer Stabilität bei niedrigen pH-Werten, bei Temperaturen über 50 °C und bei Gegenwart von Hg^{++} -Ionen. Die Isozyme werden durch PEP unterschiedlich stark gehemmt.
5. Beide Isozyme benötigen das Cosubstrat 2,3BPG für optimale Aktivität und besitzen eine durch 2-Phosphoglycolat induzierbare Bisphosphoglycerat Phosphataseaktivität. Eine Bisphosphoglyceratmutaseaktivität konnte bei beiden Enzymen nicht nachgewiesen werden.
6. Antikörper gegen PGAM-B₂ der Maus reagieren nicht gegen PGAM-A₂ der Maus.
7. Das gewebespezifische Isozymmuster bleibt in der Evolution von Knochenfischen zu den Säugern konstant. Ausnahme sind die Neunaugen und die Vögel, in deren Geweben nur ein Isozym auftritt. Haie zeigen ein Isozymmuster, das in der Gewebeverteilung und durch das Auftreten eines weiteren Isozyms im Gehirn, von denen der anderen Vertebraten abweicht.
8. Mit Ausnahme von Skelettmuskel, Herzmuskel, Niere, Hoden und Nebenhoden, tritt in allen Geweben der Maus ausschließlich das PGAM-A₂ Isozym auf. PGAM-A₂ wurde auch in Präimplantationsembryonen der Maus beobachtet.
9. Das PGAM(A₂)-Aktivitätsprofil in den Präimplantationsstadien der Maus zeigt, ausgehend von einer Aktivität von 4,6 $\mu\text{U}/\text{Embryo}$ einen Abfall im Zweizellstadium und darauf ein langsames Ansteigen bis zum Tag 5. Ein starker Aktivitätsanstieg findet vom Tag 5 auf Tag 6 statt.
10. Pgam-2 liegt mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf den Chromosomen 12, 14, 16, 18 und 19 der Maus.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse

	PGAM-A ₂	PGAM-B ₂
Molekulargewicht	56.000	56.000
Untereinheiten	2	2
Salzkonzentrationsoptimum	0 mM NaCl	50 mM NaCl
pH-Optimum	5,8-7,2	5,5-5,7
Temperaturoptimum	326 K	326 K
Aktivierungsenergie kJ/Mol Substrat	58,6	52,3
pH-Stabilität (60 min), 100 %	6,5-11,5	6,5-11,5
Temperaturstabilität (40 min)		
53 °C 0 mM 2,3BPG	25 %	100 %
53 °C 2 mM 2,3BPG	100 %	100 %
63 °C 0 mM 2,3BPG	0 %	58 %
63 °C 2 mM 2,3BPG	60 %	80 %
Hemmung bei äquimolarer Hg ⁺⁺ -Konzentration	0 %	100 %

6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Enzyme

ALD	Aldolase (D-Fructose-1,6-bisphosphate-D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase, EC 4.1.2.13)
BPGase	Bisphosphoglycerat → Phosphatase (2,3-Bisphospho-D-glycerate 2-phospho-hydrolase, EC 3.1.3.13)
CPK	Creatin-Kinase (ATP:creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2)
ENO	Enolase (2-Phospho-D-glycerate hydro-lyase, EC 4.2.1.11)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (D-Glyceraldehyde-3-phosphate:NAD ⁺ oxidoreductase (phosphorylating), EC 1.2.1.12)
GDH	Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (sn-Glycerol-3-phosphate:NAD ⁺ 2-oxidoreductase, EC 1.1.1.8)
G6PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate:NADP ⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49)
HK	Hexokinase (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1)
LDH	Lactat-Dehydrogenase (L-Lactate:NADoxidoreductase, EC 1.1.1.27)
MDH	Malat-Dehydrogenase (L-Malate:NADoxidoreductase, EC 1.1.1.37)
PFK	Fructose-6-phosphatkinase (ATP:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11)
PGAM	Phosphoglyceratmutase (2,3Bisphospho-D-glycerate: 2-phospho-D-glycerate phosphotransferase, EC 2.7.5.3)
6PGDH	6Phosphoglyconat-Dehydrogenase (6-Phospho-D-gluconate:NADP ⁺ 2-oxidoreductase (decarboxylating), EC 1.1.1.44)

PGK	Phosphoglyceratkinase (ATP:3-phospho-D-glycerate 1-phosphotransferase, EC 2.7.2.3)
PK	Pyruvatkinase (ATP:pyruvate 1-0-phosphotransferase, EC 2.7.1.40)
TPI	Triosephosphatisomerase (D-Glyceraldehyde-3-phosphate Ketol-isomerase, EC 5.3.1.1)
Adenylatkinase	(ATP:AMP phosphotransferase, EC 2.7.4.3)
α -Galactosidase	(α -D-Galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)
β -Glucuronidase	(β -D-Glucuronide glucuronosohydrolase, EC 3.2.1.31)

Substrate

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
1,3BPG	1,3Bisphospho-D-glycerat
2,3PG	2,3-Bisphospho-D-glycerat
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
GAP	D-Glyceraldehyd-3-phosphat
G3P	sn-Glycerol-3-phosphat
NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
PEP	Phosphoenolpyruvat
2PG	2-Phospho-D-glycerat
3PG	3-Phospho-D-Glycerat
Pyr	Pyruvat

Chemikalien, Puffer, PAGE

AS	Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄
BSA	Rinderserumalbumin

DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FCS	Foetales Kälberserum
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodekylsulfat
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRA	Triäthanolamin
TRAP	Triäthanolaminpuffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7. LITERATUR

Adamson, E.D.: Isoenzyme Transitions of Creatine Phosphokinase, Aldolase and Phosphoglycerate Mutase in Differentiating Mouse Cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*: 35 (2), 355-367, 1976.

Adler, D.A., West, J.D., und Chapmann, V.M.: Expression of α -Galactosidase in Preimplantation Mouse Embryos. *Nature* 267: 838-839, 1977.

Bailey, G.S., Wilson, A.C., Halver, J.E., und Johnson, C.L.: Multiple Forms of Supernatant Malate Dehydrogenase in Salmonid Fishes. *J. Biol. Chem.* 245: 5927-5940, 1970. Bailey, G.S., und Thye, L.S.: Gene Duplication in Salmonid Fish: Evolution of Lactate Dehydrogenase with an Altered Function, in *Isozymes IV, Genetics and Evolution*, 401-414, Herausgeber: Clement L. Markert, Academic Press, New York, 1975.

Bartrons, R., und Carreras, J.: Purification and Characterization of Phosphoglycerate Mutase Isozymes from Pig Heart. *Biochim. Biophys. Acta* 708: 167-177, 1982.

Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., und Pfeleiderer, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforschg.* 8b: 555-577, 1953.

Blättler, W.A., und Knowles, J.R.: Phosphoglycerate Mutases: Stereochemical Course of the Phosphoryl Group Transfers Catalyzed by the Cofactor-Dependent Enzyme from Rabbit Muscle and the Cofactor-Independent Enzyme from Wheat Germ. *Biochemistry* 19: 743-750, 1980.

Blanco, A., and Zinkham, W.H.: Lactate Dehydrogenases in Human Testes. *Science* 139: 601-602, 1963.

Bosch, J., Pons, G., und Carreras, J.: Metabolism of Glycerat-2,3-P₂-II. Enzymes Involved in the Glycerate-2,3-P₂ Metabolism in Chicken Skeletal Muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 39-48, 1982.

Brinster, R.L.: Lactate Dehydrogenase Activity in the Preimplanted Mouse Embryo. *Biochem. Biophys. Acta* 110: 439-441, 1965.

Brinster R.L.: Malic Dehydrogenase Activity in the Preimplantation Mouse Embryo. *J. Exp. Cell Res.* 43: 131-135, 1966.

Brinster, R.L.: Phosphofructokinase Activity in the Preimplantation Mouse Embryo. *Wilhelm Roux Arch.* 166: 300-302, 1971a.

Brinster, R.L.: Activity of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in the Preimplantation Mouse and Rabbit Embryo. *Experientia*, 27(4): 371-372, 1971b.

Brinster, R.L.: Isozymic Analysis of Early Mammalian Embryogenesis in Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research 3: 155-184, Herausgeber: Alan R. Liss, New York, 1979.

Bücher, Th., Bender, W., Fundele, R., Hofner, H., und Linke, I.: Quantitative Evaluation of Electrophoretic Allo- and Isozyme Patterns. *FEBS Letters* 115(2): 319-324, 1980.

Bulfield, G. Moore, E.A., und Kacser, H.: Genetic Variation in Activity of the Enzymes of Glycolysis and Gluconeogenesis between Inbred Strains of Mice. *Genetics* 89: 551-561, 1978.

Carne, T.J., McKay, D.J., und Flynn, T.G.: Studies on Phosphoglyceromutase from Chicken Breast Muscle: Number and Reactivity of Sulfhydryl Groups. *Can. J. Biochem.* 54: 307-320, 1976.

Carreras, J., Mezquita, J., Bosch, J., Bartrons, R., und Pons, G.: Phylogeny and Ontogeny of the Phosphoglycerate Mutases-IV. Distribution of Glycerate-2,3-P₂ Dependent and Independent Phosphoglycerate Mutases in Algae, Fungi, Plants and Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B(4): 591-597, 1982.

Chen, S.H., Anderson, J., Giblett, E.R., and Lewis, M.: Phosphoglyceric Acid Mutase: Rare Genetic Variants and Tissue Distribution. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 73-74, 1974.

Cohen, P.T.W., Omenn, G.S., Motulsky, A.G., Chen, S.-H., und Giblett, E.R.: Restricted Variation in the Glycolytic Enzymes of Human Brain in Erythrocytes. *Nature (New Biol.)* 241: 229-223, 1973.

Cowgill, R.W., und Pizer, L.I.: Purification and Some Properties of Phosphoglyceric Acid Mutase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 223: 885-895, 1956.

D'Alessio, G., und Josse, J.: Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase, Phosphoglycerate Kinase, and Phosphoglyceromutase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246: 4319-4325, 1971.

Darnall, D.W., und Klotz, J.M.: Subunit Constitution of Proteins: A Table. *Archives of Biochem. and Biophysics* 166: 651-687, 1975.

De Beer, G.: *The Evolution of Flying and Flightless Birds*. Oxford University Press, Oxford, 1975.

Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., Anerson, W.F., Ruddle, F.H., Lawrence, J., Creagan, R., und Kucherlapati, R.: Localization of the Human Alpha Globin Structural Gene to Chromosome 16 in Somatic Cell Hybrids by Molecular Hybridization Assay. *Cell* 12: 205-218, 1977.

Diederich, D., Khan, A., Santos, J., und Grisolia, S.: The Effect of Mercury and other Reagents on Phosphoglycerate Mutase - 2,3-Diphosphoglycerate Phosphatase from Kidney, Muscle and other Tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 212: 441-449, 1970.

DiMauro, S., Miranda, A.F., Khan, S., Gitlin, K., und Friedman, R.: Human Muscle Phosphoglycerate Mutase Deficiency: Newly Discovered Metabolic Myopathy. *Science* 212: 1277-1279, 1981.

DiMauro, S., Miranda, A.F., Marcelo, O., Friedman, R., und Mays, A.P.: Muscle Phosphoglycerate Mutase Deficiency. *Neurology* 32: 584-591, 1982.

Eicher, E.M., Cherry, M., und Flaherty, L.: Autosomal Phosphoglycerate Kinase Linked to Mouse Major Histocompatibility Complex. *Molec. gen. Genet.* 158, 225-228, 1978.

Engel, W., Schmidtke, J., und Wolf, V.: Diploid Tetraploid Relationships in Teleostean Fishes, in *Isozymes IV, Genetics and Evolution*, 449-462, Herausgeber Clement I. Markert, Academic Press, New York, 1975.

Epstein, C.J., Wegienka, E.A., und Smith, C.W.: Biochemical Development of Preimplantation Mouse Embryos: In vivo Activities of Fructose-1,6-diphosphate Aldolase, Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase. *Biochem. Genet.* 11: 33-40, 1969.

Epstein, C.J., Smith, S., Travis, B., und Tucker, G.: Both X-Chromosomes Function Before Visible X-Chromosome Inactivation in Female Mouse Embryos. *Nature* 274: 500-503, 1978.

Ferguson-Smith, M.A., und Aitken, D.A.: The Contribution of Chromosome Aberration to the Precision of Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 32: 24-42, 1982.

Fernandez, M., und Grisolia, S.: Phosphoglyceric Acid Mutase Activity without Added 2,3-Diphosphoglycerate in Preparations Purified from Rice Germ. *J. Biol. Chem.* 235: 2188-2190, 1960.

Fisher, S.E., und Whitt, G.S.: Evolution of Isozyme Loci and their Differential Tissue Expression. Creatine Kinase as a Model System. *J. Mol. Evol.* 12: 25-55, 1978.

Fothergill, L.A., und Hodgson, G.I.: Yeast Phosphoglycerate Mutase. Cyanogen Bromide Cleavage and Amino Acid Sequence of an Active-Site Peptide. *Biochem. J.* 153: 145-149, 1976.

Fundele, R.: Untersuchungen des Gen-Dosis Effekts an verschiedenen Trisomien der Maus. Diplomarbeit, LMU München, 1979.

Fundele, R., Bücher, Th., Gropp, A., und Winking, H.: Enzyme Patterns in Trisomy 19 of the Mouse. *Devel. Genet.* 2: 291-303, 1981.

Goldberg, E.: Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science* 139: 602-603, 1963.

Goodman, M., and Moore, G.W.: Phylogeny of Hemoglobin. *Systematic Zoology* 22: 508-532, 1973.

Gropp, A., Giers, D., and Kolbus, V.: Trisomy in the Fetal Backcross Progeny of Male and Female Metacentric Heterozygotes of the Mouse. I. *Cytogenet. Cell Genet.* 13: 511-535, 1974.

Gropp, A., Kolbus, V., and Giers, D.: Systematic Approach to the Study of Trisomy in the Mouse. II. *Cytogenet. Cell Genet.* 14: 32-62, 1975.

Hass, L.F., Sheibley, R.H., Kappel W.K., and Miller, K.B.: A Comparison of Some of the Physical and Chemical Properties of the Phosphoglycerate Mutases from Human Erythrocytes. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 72(3): 976-983, 1976.

Haas, L.F., and Miller, K.B.: Human Erythrocyte Phosphoglycerate Mutase: Evidence for Normal Catalysis in the Absence of Added 2,3-Bisphospho-D-Glycerate. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 95(1): 132-139, 1980.

Hardisty, M.W., and Potter, I.C.: Paired Species. *The Biology of Lampreys*, Vol.1, 249-277, 1971.

Harkness, D.R., and Ponce, J.: Purification and Properties of 3-Phosphoglyceric Acid Mutase from Caprine Erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 113-119, 1969.

Harkness, D.R., Thompson, W., Roth, S., and Grayson, V.: The Diphosphoglyceric Acid Phosphatase Activity of Phosphoglyceric Acid Mutase Purified from Human Erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 138: 208-219, 1970.

Hartmann, F.C., and Norton, L.L.: Detection of an Essential Sulfhydryl Group in Phosphoglycerate Mutase with Affinity labeling Reagent. *J. Biol. Chem.* 251(15): 4565-4569, 1976.

Hill, B., and Attwood, M.M.: Purification and Characterization of Phosphoglycerate Mutase from Methanol-grown *Hyphomicrobium* / and *Pseudomonas* AM. *J. General. Microbiol.* 96: 185-193, 1976.

Hinegardner, R. und Rosen, D.E.: Cellular DNA Content and the Evolution of Teleostean Fishes. *Am. Nat.* 106: 621-644, 1972.

Hohorst, H.J., Reim, M., und Bartels, M.: Equilibria of Two Partner Reactions of Energy Supplying Metabolism in Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7(2): 137-141, 1962.

Hubbs, C.L., und Potter, J.C.: Distribution, Phylogeny and Taxonomy. in *The Biology of Lampreys*, Vol. 1, 1-65. Herausgeber: Hardisty und Potter, Academic Press, London, 1971.

Ikura, K., Narita, H., Sasaki, R., und Chiba, H.: Immunochemical and Enzymatic Properties of Bisphosphoglyceromutase/phosphatase and Phosphoglyceromutase from Human Erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 89: 23-31, 1978.

Ito, N., und Grisolia, S.: Phosphoglyceric Acid Mutase Activity without Added 2,3 Diphosphoglycerate in Preparations. Purified from Wheat Germ. *J. Biol. Chem.* 234: 242-245, 1959.

James, F., Hurst, R.O., und Flynn, T.G.: Multiple Forms of Phosphoglyceromutase from Chicken Breast Muscle. *Can. J. Biochem.* 50: 1132-1142, 1972.

James, F., Hurst, R.O., und Flynn, T.G.: Purification and Properties of Phosphoglyceromutase from Sheep Muscle. *Can. J. Biochem.* 49: 1183-1194, 1971.

Junien, C., Despoisse, S., Turleau, C., Grouchy, J. de, Bücher, Th., und Fundele, R.: Assignment of Phosphoglycerate Mutase (PGAM) to Human Chromosome 10. Regional Mapping of GOT1 and PGAM to Subbands 10q26.1 (or q25.3). *Ann. Génét.* 25(1): 25-27, 1982.

Kawai, K., Mori, M., Eguchi, T., Horitsu, H., und Eguchi, Y.: Affinity of Leucostoc Phosphoglycerate Mutase for Blue Dextran Sepharose. *Agric. Biol. Chem.* 45 (12): 2781-2786, 1981.

Klose, J., Wolf, V., Hitzeroth, H., Ritter, H., und Ohno, S.: Polyploidization in the Fish Family Cyprinidae, Order Cypriniformes. II Duplication of the Gene Loci Coding for Lactate Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) and 6 Phosphogluconate Dehydrogenase (EC 1.1.1.44) in Various Species of Cyprinidae. *Humangenetik* 7: 245-250, 1969.

Koblet, H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971.

Kozak, L.P., und Quinn, P.J.: Evidence for Dosage Compensation of an X-linked Gene in the 6-Day Embryo of the Mouse. *Dev. Biol.* 45: 65-73, 1975.

Kremer, B.P.: Wasserfrösche sind Bastarde. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 36 (1): 28-29, 1983.

Krietsch, W.K.G., Fundele, R., Kuntz, G.W.K., Fehlau, M., Bürki, K., und Illmensee, K.: The Expression of X-linked Phosphoglycerate Kinase in the Early Mouse Embryo. *Differentiation* 23: 141-144, 1982.

Kulbe, K.D., Fuchs, J., und Foellmer, H.: Mammalian Liver and Skeletal Muscle Contain Different Isoenzymes of Phosphoglyceromutase. *Gesellschaft Biol. Chem.* 360(179): 1168, 1979.

Kulbe, K.D., Foellmer, H., und Fuchs, J.: Simultaneous Purification of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerate Kinase, and Phosphoglycerate Mutase from Pig Liver and Muscle. in *Methods in Enzymology*, Vol. 90, 498-511, Herausgeber: W.A. Wood, Academic Press 1982.

Kuntz, G.W.K., und Krietsch, W.K.G.: Phosphoglycerate Kinase from Animal Tissue. in *Methods in Enzymology* 90: 103-110, Herausgeber W.A. Wood, Academic Press, New York, 1982a.

Kuntz, G.W.K., und Krietsch, W.K.G.: Phosphoglycerate Kinase from Spinach, Blue-Green Algae, and Yeast. in *Methods in Enzymology* 90: 110-114, Herausgeber W.A. Wood, Academic Press, New York, 1982b.

Mezquita, J., und Carreras, J.: Phylogeny and Ontogeny of the Phosphoglycerate Mutase-I. Electrophoretic Phenotypes of the Glycerat-2,3 P₂ Dependent Phosphoglycerate Mutase in Vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 10B, 237-245, 1981.

Mezquita, J., Bartrons, R., Pons, G., und Carreras, J.: Phylogeny and Ontogeny of the Phosphoglycerate Mutases -II. Characterization of Phosphoglycerate Mutase Isozymes from Vertebrates by their Thermal Lability and Sensitivity to the Sulfhydryl Group Reagents. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B: 241-255, 1982.

Michal, G.: D-Glycerat-2,3-diphosphat. in "Methoden der enzymatischen Analyse", 1478-1483, Herausgeber H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, 1974.

Narita, H., Utsumi, S., Ikura, K., Sasaki, R., und Chiba, H.: Comparative Studies of the Enzymes Involved in 2,3-Bisphosphoglycerate Metabolism of Rabbit Erythrocytes and Muscle Cells. *Int. J. Biochem.* 10: 25-38, 1979.

Niebauer, H.-J.: Isolierung und Charakterisierung der Phosphoglyceratmutase aus Humanerythrozyten. Diplomarbeit, LMU München, 1975.

Nielsen, J.T., und Chapman, V.M.: Electrophoretic Variation for X-Chromosome-Linked Phosphoglycerate Kinase (PGK-1) in the Mouse. *Genetics* 87: 319-325, 1977.

Oh, Y.K., und Freese, E.: Manganese Requirement of Phosphoglycerate Phosphomutase and Its Consequences for Growth and Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 127(2): 739-746, 1976.

Ohno, S., Wolf, V., und Atkin, N.B.: Evolution from Fish to Mammals by Gene Duplication. *Hereditas* 59: 169-187, 1968.

Ohno, S.: Evolution by Gene Duplication. Springer Verlag, Berlin, 1970.

Omenn, G.S., und Cheung, S.C.-Y.: Phosphoglycerate Mutase Isozyme Marker for Tissue Differentiation in Man. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 393-399, 1974.

Omenn, G.S., und Hermodson, M.A.: Human Phosphoglycerate Mutase: Isozyme Marker for Muscle Differentiation and for Neoplasia in Isozymes III. *Developmental Biology*, 1005-1018, Herausgeber: Clement L. Markert, Academic Press, New York, 1975.

Ostrom, J.H.: Archaeopteryx and the Origin of Flight. *Q. Rev. Biol.* 49: 27-47, 1974.

Petell, J.K., Killion, R.B., und Lebherz, H.G.: Isolation of Several Abundant Muscle Enzymes. in *Methods in Enzymology*, Vol. 90: 490-497, Herausgeber: W.A. Wood, Academic Press, 1982.

Rodwell, V.W., Towne, J.C., und Grisolia, S.: The Kinetic Properties of Yeast and Muscle Phosphoglyceric Acid Mutase. *J. Bio. Chem.* 228: 875-890, 1957.

Romer, A.S.: *Vertebrate Palaeontology*. 3. Ausgabe, The University of Chicago Press, Chicago, 1966.

Romer, A.S.: *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere*. Paul Parey Verlag, Hamburg, 1971.

Rosa, R., Audit, J., und Rosa, J.: Presence of a Diphosphoglycerate Phosphatase Activity in the Multiple Molecular Forms of 3-Phosphoglycerate Mutase. in *Isozymes I, Molecular Structure*, 695-706, Herausgeber: Clement L. Markert, Academic Press, London New Yorck, 1975.

Rose, Z.B., und Dube, S.: Phosphoglycerate Mutase and Bisphosphoglycerate Phosphatase Activities of the Enzyme from Chicken Breast Muscle. *J. Biol. Chem.* 253(23): 8583-8592, 1978.

Sasaki, R., Ikura, K., Sugimoto, E., und Chiba, H.: Purification of Bisphosphoglyceromutase, 2,3-Bisphosphoglycerate Phosphatase, and Phosphoglyceromutase from Human Erythrocytes. Three Enzyme Activities in One Protein. *Eur. J. Biochem.* 50: 581-593, 1975.

Sasaki, R., Ikura, K., Narita, H., und Chiba, H.: Multifunctionality of the Enzyme Involved in the 2,3-Diphosphoglycerate Metabolism of Pig Erythrocytes. *Agr. Biol. Chem.* 40(11): 2213-221, 1976.

Schmidtke, J., und Engel, W.: Duplication of the Gene Loci Coding for the Supernatant Aspartate Aminotransferase by Polyploidization in the Fish Family Cyprinidae. *Experientia* 28: 976-978, 1972.

Schulman, M.D., und Valentino, D.: Purification, Characterization and Inhibition by MK-401 of *Fasciola Hepatica* Phosphoglyceromutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5: 321-332, 1982.

Scopes, R.K.: Multiple Enzyme Purifications from Muscle Extracts by Using Affinity-Elution-Chromatographic Procedures. *Biochem. J.* 161: 265-277, 1977.

Scopes, R.K., und Stoter, A.: Purification of All Glycolytic Enzymes from One Muscle Extract. in *Methods in Enzymology*, Vol. 90: 479-490, Herausgeber: W.A. Wood, Academic Press, 1982.

Scopes, R.: *Protein Purification*. Herausgeber Ch.R. Cantor, Springer Verlag, 1982.

Sheibley, R.H., und Hass, L.F.: Isolation and Partial Characterization of Monophosphoglycerate Mutase from Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 251, 6699-6074, 1976.

Singh, R.P., und Setlow, P.: Purification and Properties of Phosphoglycerate Phosphomutase from Spores and Cells of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 137(2): 1024-1027, 1979.

Spielmann, H., Erickson, R.P., und Epstein, C.J.: Immunochemical Studies of Lactate Dehydrogenase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Preimplantation Mouse Embryos. *J. Reprod. Fertil.* 40: 367-373, 1974.

Tarkowski, A.K.: An Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs. *Cytogenetics* 5: 394-400, 1966.

Torralba, A., und Grisolia, S.: The Purification and Properties of Phosphoglycerate Mutase from Chicken Breast Muscle. *J. Biol. Chem.* 241 (8): 1713-1718, 1966.

VandeBerg, J.L., Cooper, D.W., und Close, P.J.: Mammalian Testis Phosphoglycerate Kinase. *Nature (New Biol.)* 243: 48-50, 1973.

VandeBerg, J.L., Cooper, D.W. und Close, P.J.: Testis Specific Phosphoglycerate Kinase in the Mouse. *J. Exp. Zool.* 198: 231-240, 1976.

Vora, S., und Francke, U.: Assignment of the Human Gene for Liver-Type 6-Phosphofructokinase Isozyme (PFKL) to Chromosome 21 by Using Somatic Cell Hybrids and Monoclonal Anti-L Antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(6): 3738-3742, 1981.

VandeBerg, J.L., und Klein, J.: Localization of Mouse Pgk-2 Gene at the D End of the H₂-Complex. *J. Exp. Zool.* 203: 319-324, 1978.

Watabe, K., und Freese, E.: Purification and Properties of the Manganese-Dependent Phosphoglycerate Mutase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 137(2): 773-778, 1979.

Weil, D., Cottreau, D., Cong, N.V., Rebouret, R., Foubert, C., Gross, M.-S., Dreyfus, J.-C., und Kahn, A.: Assignment of the Gene for F-type Phosphofructokinase to Human Chromosome 10 by Somatic Cell Hybridization and Specific Immunoprecipitation. *Ann. Hum. Genet.* 44: 11-16, 1980.

Whitt, G.S., Shaklee, J.B. und Markert, C.L.: Evolution of the Lactate Dehydrogenase Isozymes of Fishes. in *Isozymes IV, Genetics and Evolution*, 381-400, Herausgeber: Clement, L. Markert, Academic Press, N.Y., 1975.

Willets, A.: Kinetic Control of Phosphoglycerate Mutase from *Flavobacterium* Sp. Grown on Ethylene Glycol. *Biochim. Biophys. A.* 588: 20-25, 1979.

Wolf, V., und Engel, W.: Gene Activation During Early Development of Mammals. *Human Genet.* 15: 99-118, 1972.

Wood, S.C., und Lenfant, C.J.M.: Respiration: Mechanics, Control and Gas Exchange. in *Biology of the Reptilia*, Vol. 5, 225-274, Ed. C. Gans und W.P. Dawson, Academic Press, London, 1976.

Wudl, L., und Chapman, V.M.: The Expression of β -Glucuronidase During Pre-implantation Development of Mouse Embryos. *Dev. Biol.* 48: 104-109, 1976.

Lebenslauf

- 9.3.1951 Geboren in Kreßbronn/Bodensee als Kind von Reinald Fundele und Margot Fundele, geb. Brodbeck.
- 1957 Eintritt in die Volksschule in Kreßbronn, noch im selben Jahr Wechsel nach Kaufbeuren/Allgäu.
- 1957-1960 Besuch der Volksschule in Kaufbeuren.
- 1960-1965 Schüler am humanistischen Gymnasium in Kaufbeuren.
- 1965-1966 Besuch des humanistischen Zweigs des Bodensee-Gymnasiums in Lindau/Bodensee.
- 1966-1968 Besuch der Deutschen Schule Lissabon, Wechsel vom humanistischen zum neusprachlichen Zweig.
- 1968-1970 Wechsel an das Joseph-Hofmiller-Gymnasium in Freising.
- 1970 Reifeprüfung und Beginn des Chemiestudiums an der Universität Würzburg im Wintersemester 1970/71.
- 1971 **Abbruch** des Chemiestudiums.
- 1972 Beginn des **Biologiestudiums** an der Ludwigs-Maximilians-**Universität in München** im Wintersemester 1972/73.
- 1975 Vordiplom
- 1977 **Diplomhauptprüfung** und Beginn der Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof.Dr.Dr.h.c. Th. Bücher am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biologie und Zellbiologie, Thema der Arbeit: Untersuchungen des Gen-Dosis Effekts an verschiedenen Trisomien der Maus.
- 1979 Abschluß der Diplomarbeit
- 1980 Beginn der Dissertation im Arbeitskreis von Prof.Dr. W.K.G. Krietsch am gleichen Institut.

